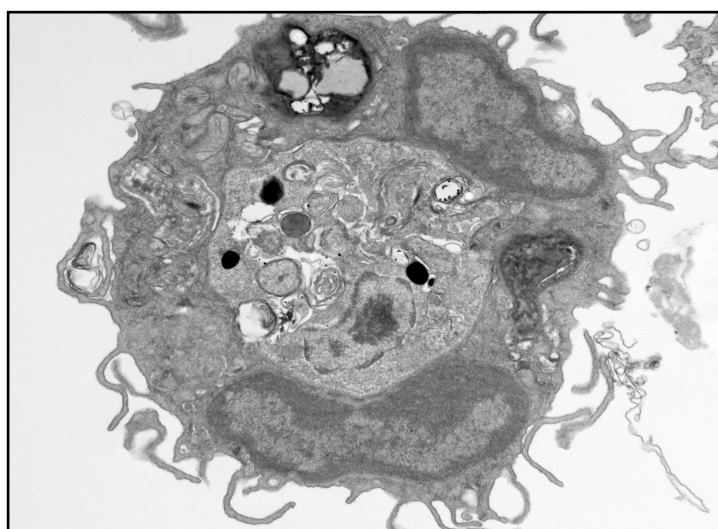


**FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

**ESTUDIO DEL ORIGEN Y LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS
DENDRÍTICAS INFLAMATORIAS DURANTE LA INFECCIÓN POR
*LEISHMANIA MAJOR***



TESIS DOCTORAL

ELENA LIARTE MARÍN

Madrid, Abril 2013

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Inmunología y Oncología del Centro Nacional de Biotecnología, CSIC (Madrid), bajo la dirección del **Doctor Carlos Ardavín Castro**.

ÍNDICE

5	ÍNDICE
11	ABREVIATURAS
15	SUMMARY
19	INTRODUCCIÓN
21	Células Dendríticas
21	DCs en homeostasis
21	DCs convencionales
21	DCs residentes
23	DCs migratorias
25	pDCs
26	DCs en inflamación
26	Origen de las células dendríticas
28	Monocitos como precursores de DCs y macrófagos
30	Monocitos Ly6C ^{low}
30	Monocitos Ly6C ^{high}
31	Diferenciación a células dendríticas
32	TipDCs: DCs productoras de TNF- α y óxido nítrico
33	Diferenciación a macrófagos
34	Factores que determinan la diferenciación de monocitos <i>in vivo</i>
36	<i>Leishmania major</i>
37	Ciclo de vida del parásito <i>Leishmania</i>
38	Inmunidad innata contra <i>Leishmania major</i>
39	Inmunidad adaptativa contra <i>Leishmania major</i>
41	OBJETIVOS
45	MATERIALES Y MÉTODOS
47	Materiales Biológicos
47	Ratones
47	Líneas celulares y patógenos
47	Reactivos
47	Medios de cultivo
48	Anticuerpos monoclonales
48	Metodología
48	Preparaciones celulares
48	Suspensiones celulares de médula ósea

49	Suspensiones celulares de sangre
49	Suspensiones celulares de ganglios linfáticos y dermis
49	Fracciones celulares enriquecidas en DCs
50	Aislamiento de poblaciones celulares
50	Aislamiento de monocitos
50	Aislamiento de DCs de los cultivos de moDCs
50	Aislamiento de monocitos de los cultivos de moDCs
50	Cultivos Celulares
50	Mantenimiento de los cultivos de <i>Leishmania major</i>
51	Diferenciación de DCs y Mφ derivados de monocitos
51	Diferenciación de DCs <i>in vitro</i> en presencia de promastigotes o amastigotes de <i>Leishmania major</i>
51	Microscopía óptica
51	Microscopía confocal
52	Tinción GIEMSA
52	Ensayos <i>in vivo</i>
52	Infección <i>in vivo</i> con promastigotes de <i>Leishmania major</i>
52	Tratamiento con mAb anti-mouse IL3
53	Tratamiento con mAb anti-MCSF-R
53	Sensibilización de la dermis para detectar la migración de DCs
53	Análisis de la proliferación de las subpoblaciones de DCs mediante incorporación de BrdU
53	Transferencia de monocitos en ratones infectados con <i>Leishmania major</i>
54	Citometría de flujo
54	Caracterización de monocitos aislados de médula ósea
54	Caracterización de las DCs y de los macrófagos diferenciados <i>in vitro</i> derivados de monocitos
54	Marcaje intracelular
55	Análisis de las subpoblaciones celulares en el ganglio linfático de ratones infectados con <i>Leishmania major</i>
55	Análisis de las subpoblaciones celulares en la dermis de ratones infectados con <i>Leishmania major</i>
55	Análisis de las subpoblaciones celulares infectadas con <i>Leishmania major</i>
55	Análisis de las células derivadas de los monocitos marcados con CFSE y transferidos en ratones infectados con <i>Leishmania major</i>

57	RESULTADOS
59	Estudio de la cinética de las poblaciones de monocitos y DCs en los PO-LNs y en la dermis de ratones C57BL/6 durante la infección por <i>Leishmania major</i>
59	Caracterización de las subpoblaciones celulares presentes en los ganglios poplíteos durante la infección con <i>Leishmania major</i> en ratones C57BL/6
61	Cinética de las subpoblaciones celulares presentes en los ganglios poplíteos durante la infección con <i>Leishmania major</i> en ratones C57BL/6
62	Caracterización de las subpoblaciones celulares presentes en la dermis durante la infección con <i>Leishmania major</i> en ratones C57BL/6
64	Cinética de las subpoblaciones celulares presentes en la dermis durante la infección con <i>Leishmania major</i> en ratones C57BL/6
65	Análisis de la diferenciación <i>in vivo</i> en dDCs y moDCs de los monocitos transferidos por vía intravenosa en ratones C57BL/6 infectados con <i>Leishmania major</i>
67	Origen y diferenciación de las dcs inflamatorias presentes en el po-ln y en la dermis durante la infección por leishmania major
67	Caracterización de las subpoblaciones celulares presentes en los ganglios poplíteos durante la infección con <i>Leishmania major</i> en ratones CCR2 KO
68	Cinética de las subpoblaciones celulares presentes en los ganglios poplíteos durante la infección con <i>Leishmania major</i> en ratones CCR2 KO
69	Caracterización de las subpoblaciones celulares presentes en la dermis durante la infección con <i>Leishmania major</i> en ratones CCR2 KO
70	Cinética de las subpoblaciones celulares presentes en la dermis durante la infección con <i>Leishmania major</i> en ratones CCR2 KO
71	Análisis del grado de infección de las subpoblaciones presentes en los ganglios poplíteos y en la dermis de ratones C57BL/6 y ratones CCR2 KO
73	Análisis de la migración de las dDCs a los ganglios linfáticos, en ratones C57BL/6 y CCR2 KO infectados con <i>Leishmania major</i>
74	Análisis del estado de proliferación de las distintas subpoblaciones de monocitos y DCs durante la infección con <i>Leishmania major</i> en ratones C57BL/6
76	Análisis de los factores implicados en la diferenciación <i>in vivo</i> de monocitos a DCs en la dermis y en los ganglios poplíteos de ratones C57BL/6 durante la infección con <i>Leishmania major</i>
80	Análisis de la diferenciación de macrófagos durante la infección con <i>Leishmania major</i>.
80	Potencial de los monocitos como precursores de macrófagos <i>in vivo</i> durante infección por <i>Leishmania major</i>

83	DISCUSIÓN
85	Los monocitos como precursores de DCs inflamatorias inducidas por infección
86	Efecto de la deficiencia de CCR2 sobre el reclutamiento de monocitos y la generación de DCs inflamatorias durante infección con <i>Leishmania major</i>
88	Subpoblaciones y origen de las células dermales en la dermis y de las que se denominan dermales en los ganglios periféricos
91	Citoquinas implicada en la diferenciación de células dendríticas durante procesos infecciosos e inflamatorios
92	Diferenciación de macrófagos durante procesos inflamatorios
95	CONCLUIONES
101	BIBLIOGRAFIA

ABREVIATURAS

APCs:	células presentadoras de antígenos
APC:	aloficocianina
BMDc:	células dendríticas derivadas de médula ósea
CCR:	receptor de quimioquinas
CD:	antígeno de diferenciación
cDCs:	células dendríticas convencionales
CDP:	precursor común de células dendríticas
CFSE:	carboxifluoresceína
CLP:	precursor linfoide común
CLR:	receptor lectina tipo C
CMP:	precursor mieloide común
CpG:	oligodesoxinucleótidos desmetilados de citosina y guanina
CTLs:	linfocitos T citotóxicos
DCs:	células dendríticas
dDCs:	células dendríticas dermales
EDTA:	ácido etilendiaminotetraacético
ELISA:	ensayo colorimétrico
ERK:	quinasa regulada por señales extracelulares
FcR:	receptor de la fracción constante de la inmunoglobulina
FCS:	suero fetal de ternera
FITC:	isotiocianato de fluoresceína
Flt3:	<i>fms-like tyrosin kinase</i>
Flt3-L:	ligando de Flt3
FSC:	tamaño
GFP:	proteína fluorescente verde
GM-CSF:	factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
HEVs:	vénulas de endotelio alto
HSC:	células madre hematopoyéticas
Igs:	inmunoglobulinas
IL:	interleuquina
IFN:	interferón
IFN-I:	interferón de tipo I
IFNγ:	interferón γ
iNOS:	sintasa de óxido nítrico inducible
LCs:	células de Langerhans
LN:	ganglio linfático
LPS:	lipopolisacárido bacteriano
mAbs:	anticuerpos monoclonales
MACS:	separación celular magnética
MAPK:	quinasa activada por mitógenos

M-CSF:	factor estimulador de colonias de macrófagos
MDP:	precursor común de células dendríticas y macrófagos
MHC:	complejo principal de histocompatibilidad
MHC-I:	complejo principal de histocompatibilidad de tipo I
MHC-II:	complejo principal de histocompatibilidad de tipo II
moDC:	célula dendrítica derivada de monocitos
mRNA:	ácido ribonucleico mensajero
NK:	célula <i>natural killer</i>
NO:	óxido nítrico
PAMPs:	patrones moleculares asociados a patógenos
PBS:	tampón fosfato salino
pDC:	célula dendrítica plasmacitoide
PE:	ficoeritrina
PerCP:	peridina de clorofila a
PNA:	adhesina de los ganglios linfáticos periféricos
poly(I:C):	análogo sintético de RNA de doble hélice
pre-DCs:	precursor de células dendríticas convencionales
PRRs:	receptores de reconocimiento de patrones
PSGL-1:	glicoproteína de unión a P-selectina
RT-PCR:	transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa
SSC:	complejidad
STAT:	factor transductor de señales y activador de la transcripción
TCR:	receptor de la célula T
Th:	células T colaboradoras
Th1:	células Th de tipo 1
Th2:	células Th de tipo 2
Th17:	células Th de tipo 17
TLRs:	receptores <i>Toll-like</i>
TNF-α:	factor de necrosis tumoral α

SUMMARY

This research work is based on previous studies performed in our laboratory, relying on the *Leishmania major* infection model, that demonstrated for the first time the potential of monocytes to differentiate into dendritic cells in vivo during infectious processes. As a follow-up of these studies, we have addressed, using the same experimental model, a number of unresolved issues related to the differentiation of dendritic cells, that included - the contribution of monocytes to the generation of the different dendritic cell subsets present in the dermal infection focus and draining lymph nodes, - the origin of the dermal dendritic cells during infectious processes, - the definition of the growth factors controlling the differentiation of these different dendritic cell subsets and - the differentiation of the different macrophage subsets present in the lymph nodes draining the infected skin. For this purpose, a series of experiments have been performed in C57BL/6 mice infected with *Leishmania major* in the hind footpad in order to - define the phenotype and differentiation kinetics of the different dendritic cell subsets present in the dermis and draining lymph nodes, - determine their level of infection, proliferation status and migration capacity, - explore the potential of monocytes as precursors for these dendritic cell subsets through monocyte intravenous transfer assays and analysis of CCR2-deficient mice, - define the cytokines controlling the differentiation of the different subsets of dendritic cells and macrophages using mice deficient in the receptor for GM-CSF or the receptor Flt3, as well as mice treated with anti-IL-3 or anti-M-CSF-R antibodies. The results derived from this research work have allowed to define the relative contribution of monocytes and pre-DC precursors to the generation of the different dendritic cell subsets present in the dermis and draining lymph nodes of *Leishmania major* infected mice, the monocytic origin of dermal dendritic cells during infectious processes, as well as the role of the cytokines GM-CSF, M-CSF and Flt3L in the differentiation of the different subsets of dendritic cells and macrophages during *Leishmania major* infection.

INTRODUCCIÓN

CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las células dendríticas (DCs del inglés *dendritic cells*) son células especializadas en la presentación de antígenos y principales inductoras de la respuesta de linfocitos T antígeno específica. Por un lado, son capaces de reconocer distintos componentes de patógenos denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) a través de la expresión de receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PRRs) tales como, TLRs (del inglés, *toll-like receptors*), receptores lectina de tipo C o receptores citoplásmicos. Tras esta activación, se inicia la síntesis de distintas citoquinas, quimioquinas y otros factores que activan la defensa innata (Akira et al., 2006). Por otra parte, resultan esenciales en la captura, procesamiento y presentación de antígenos derivados de patógenos y tumores asociados a moléculas de MHC, tras lo cual, inician un proceso de maduración y migración hacia las zonas T de los órganos linfoides para llevar a cabo la presentación a células T específicas (Reis e Sousa, 2006). De la misma manera, son las principales inductoras de la activación y proliferación de células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas y la polarización de las respuestas T helper (Villadangos and Schnorrer, 2007). De igual forma, son las encargadas de mantener la tolerancia, tanto central como periférica, frente a antígenos propios (Probst et al., 2005). Por todo ello, las DCs suponen un vínculo fundamental entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. Las DCs representan un conjunto de células muy heterogéneo que puede clasificarse en base a la expresión de proteínas de superficie, a su localización anatómica y sus respuestas funcionales. Esta gran plasticidad hace que su papel sea fundamental en procesos tan dispares como puedan ser las infecciones microbianas, reacciones alérgicas, respuestas antitumorales o enfermedades autoinmunes.

1.1. DCs en homeostasis

En el ratón, en condiciones de reposo, las DCs se localizan en los órganos linfoides como el bazo, los ganglios linfáticos periféricos y el timo y en tejidos linfoides asociados a mucosas como la *lamina propria*, el tracto gastrointestinal, el tracto respiratorio o el genitourinario. Pueden clasificarse en 2 grupos principales; las DCs convencionales, que engloban las DCs residentes y las DCs migratorias, y las pDCs.

1.1.1.DCs convencionales

1.1.1.1. DCs residentes

Las DCs residentes derivan de precursores hematopoyéticos provenientes de la médula ósea, que migran a través de la sangre y son reclutados a los distintos órganos y tejidos linfoides donde completan su diferenciación. Dentro de las células que residen en los órganos linfoides

podemos encontrar 3 subpoblaciones distintas en base a la expresión de varios marcadores de superficie (Lopez-Bravo and Ardavin, 2008); (Shortman and Heath, 2010).

Las DCs $CD8\alpha^+$ ($CD4^-$, $CD11b^-$, $CD11c^{hi}$, $MHC-II^+$, $CD24^+$) suelen localizarse mayoritariamente cerca de las áreas T de la pulpa blanca del bazo y el paracórtex de los ganglios linfáticos periféricos. Son muy eficaces fagocitando células apoptóticas debido a la expresión de receptores específicos como CD36, DEC-205 y Clec9A implicados en este proceso (Albert et al., 1998); (Iyoda et al., 2002); (Sancho et al., 2009). Además, recientemente se ha descrito que el receptor de quimioquinas XCR1, es un marcador específico de esta subpoblación (Croizat et al., 2010).

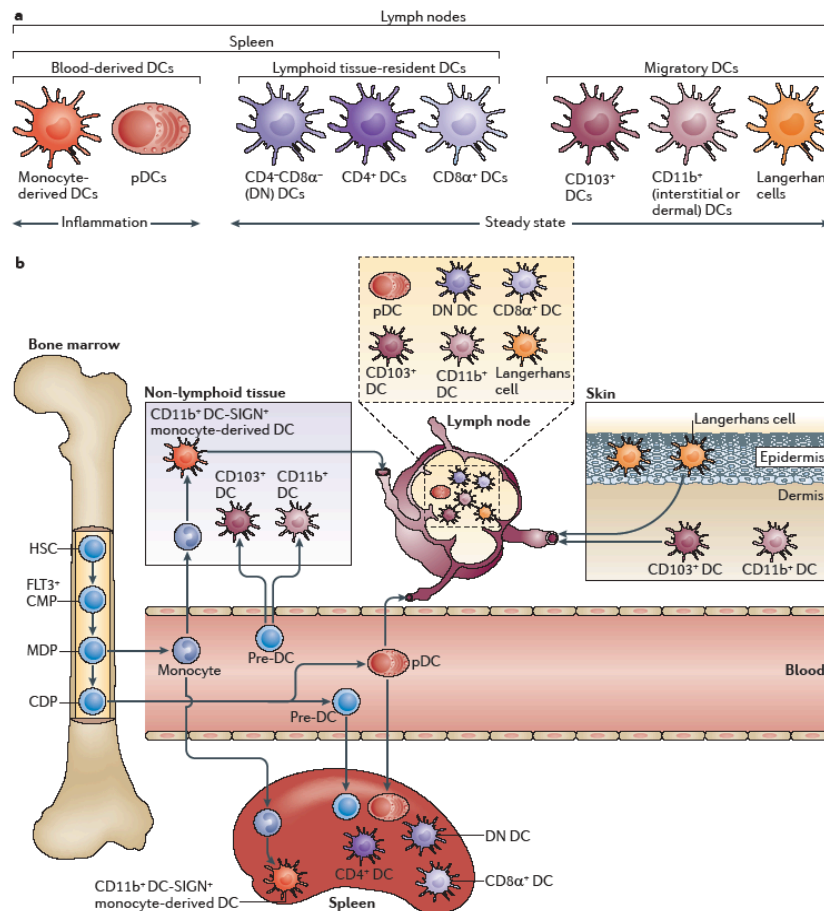
En comparación con otras DCs del bazo, están especializadas en la presentación de antígenos exógenos tanto asociados a células como en forma soluble, unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I, MHC-I, para estimular respuestas linfocitarias T $CD8^+$, proceso que se conoce como presentación cruzada (den Haan et al., 2000); (Dudziak et al., 2007). Por ello, tienen un papel fundamental en la inducción de respuestas inmunes *in vivo* durante infecciones virales como el virus del herpes simple, el virus de la gripe o el virus de la coriomeningitis linfocítica, LCMV (Allan et al., 2003); (Smith et al., 2003); (Belz et al., 2004a); (Belz et al., 2005)). También resultan de gran relevancia en otras infecciones por patógenos intracelulares como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* o *Toxoplasma gondii* (Edelson et al., 2011); (Sundquist and Wick, 2009); (Mashayekhi et al., 2011)).

En situación de reposo se encuentran en estado inmaduro caracterizado por su actividad fagocítica y una menor expresión de moléculas MHC y de coestimulación (Wilson et al., 2003). Tras la activación por una citoquina proinflamatoria, la captación antigénica o fagocitosis de células apoptóticas inician un proceso de maduración y migran desde la zona marginal del bazo a la pulpa blanca para la presentación cruzada de dichos antígenos.

Además tras diversos estímulos microbianos, las DCs $CD8\alpha^+$ son capaces de producir grandes cantidades de IL-12 y por tanto de inducir la polarización de linfocitos T $CD4^+$ hacia respuestas Th1 como de promover respuestas T citotóxicas en los linfocitos T $CD8^+$ (Trinchieri, 2003).

Por otra parte, también se ha descrito que las DCs $CD8\alpha^+$ tiene un papel muy importante en la inducción de la tolerancia periférica. Trabajos anteriores han demostrado que las DCs $CD8\alpha^+$ de los ganglios linfáticos pueden adquirir antígenos provenientes de tejidos periféricos transferidos por las DCs migratorias que entran al ganglio a través la linfa e inducir tolerancia mediante delección de linfocitos T $CD8^+$ autorreactivos tras presentación cruzada de antígenos propios (Hawiger et al., 2001); (Belz et al., 2002); (Bonifaz et al., 2002).

La segunda subpoblación de DCs residentes, son las DCs $CD8\alpha^- CD4^+$, $CD11b^+$, $CD11c^{hi}$, $MHC-II^+$, $Sirp-\alpha^+$) que se localizan preferentemente en la zona marginal del bazo y cerca del seno subcapsular de los ganglios linfáticos periféricos. Dentro de este grupo se incluyen las DCs $CD8\alpha^- CD4^-$ ($CD11b^+$, $CD11c^{hi}$, $MHC-II^+$) o también denominadas dobles negativas (DN). Son más eficientes que las DCs $CD8\alpha^+$ en capturar antígenos exógenos por vía endocítica y fagocítica, mediado por receptores como SIGNR1 y DCIR-2 (33D1), presentarlos asociados a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II, MHC-II, e inducir la respuesta inmune de linfocitos T $CD4^+$ (Pooley et al., 2001); (Allenspach et al., 2008).



Beltz et al., 2012 Nat Rev Immunol

Figura 1. Diferenciación de los distintos subtipos de células dendríticas

1.1.1.2. DCs migratorias

Las DCs migratorias son las que residen en los tejidos no linfoides como pueden ser la piel, el intestino, el pulmón, el hígado y los riñones. Derivan de precursores reclutados a los distintos tejidos periféricos (Randolph et al., 2005). Poseen una gran capacidad de capturar y procesar antígenos derivados de patógenos debido a la expresión de diferentes receptores endocíticos y fagocíticos. Tras esta activación las DCs migratorias adquieren un fenotipo maduro y migran

hacia las áreas T de los ganglios linfáticos drenantes por un proceso dependiente de CCR7 (Forster et al., 1999); (Randolph et al., 2008). Una vez allí, pueden iniciar respuestas inmunes específicas directamente mediante presentación antigénica a linfocitos T en el contexto de moléculas MHC-II o de manera indirecta por transferencia de antígeno a las DCs residentes CD8 α ⁺ que iniciarán respuestas inmunes preferentemente mediante presentación cruzada de los antígenos transferidos (Belz et al., 2004b); (Allan et al., 2006).

Las DCs migratorias pueden ser divididas en distintas subpoblaciones en base a la expresión de moléculas de superficie como CD103 y CD11b. En la piel existen al menos tres subtipos, las células de Langerhans (LCs) que residen en la epidermis y dos subpoblaciones de DCs dermales que se encuentran en la dermis (Merad et al., 2008); (Helft et al., 2010).

Las LCs se caracterizan por el siguiente fenotipo; MHC-II^{hi}, CD207^{hi}, CD11c⁺, CD11b^{int}, CD205⁺ y EpCAM⁺ y por la presencia de gránulos de Birbeck en el citoplasma. Constituyen entre el 3-5% de las células que componen la epidermis y forman una extensa red ocupando los intersticios que dejan los queratinocitos (Merad et al., 2008). Se originan a partir de precursores que colonizan la dermis durante el desarrollo embrionario, completan su diferenciación tras el nacimiento y se renuevan localmente de manera autónoma (Chorro et al., 2009), (Merad et al., 2002). Su función en la inducción de tolerancia hacia antígenos propios es clara, sin embargo, su función en cuanto a la inducción de respuestas inmunogénicas no ha sido esclarecida, ya que su depleción en modelos de infección de piel como *Leishmania major*, el virus Vaccinia o el virus del herpes simple concluyen que las LCs son totalmente prescindibles (Kautz-Neu et al., 2011); (Deng et al., 2006); (Allan et al., 2003).

En la dermis encontramos una población de DCs CD103⁺, CD11b^{lo}, CD207⁺ CD11c^{hi}, MHC-II⁺ (Ginhoux et al., 2007); (Poulin et al., 2007); (Bursch et al., 2007) y otra CD103⁻, CD11b^{hi}, CD207⁻ CD11c^{hi}, MHC-II⁺ (Ginhoux et al., 2009). Ambas subpoblaciones, a las que nos referiremos como DCs CD103⁺ y DCs CD11b⁺ respectivamente, se encuentran también en el pulmón, el hígado, los riñones, el páncreas y en la *lámina propia* y las placas de Peyer del intestino (Ginhoux et al., 2009). En la dermis, la población de DCs CD11b⁺ representa un 70% del total de DCs presentes. Experimentos de transferencia adoptiva apuntan a que parte de esta población podría tener origen monocítico, aunque en algunos tejidos, como el hígado y el riñón, también pueden diferenciarse a partir de pre-DCs, por ello la contribución de los distintos precursores está aún por determinar (Ginhoux et al., 2009). En lo que respecta a su función, en un modelo de inmunización cutánea que produce inflamación crónica de la piel, se ha observado que las DCs CD11b⁺ son las responsables de la inducción de la producción de citoquinas por parte de las células T CD4⁺ y las células T reguladoras que infiltran la dermis (McLachlan et al., 2009). Además las DCs CD11b⁺ son más eficaces en la presentación de antígenos en el contexto de moléculas MHC-II y en la activación de linfocitos T CD4⁺ en distintos modelos de infección viral (Bedoui et al., 2009).

La población de DCs CD103⁺ se origina a partir de pre-DCs y dependen del receptor Flt3 para su desarrollo (Bogunovic et al., 2009); (Ginhoux et al., 2009); (Liu et al., 2009); (Naik et al., 2007); (Onai et al., 2007); (Varol et al., 2009). Recientemente, se ha descrito que esta subpoblación está estrechamente relacionada con las DCs residentes CD8⁺ de los órganos linfoides (Bedoui et al., 2009), ya que, además de compartir características fenotípicas como la expresión de DEC-205 y CD24, su diferenciación es dependiente de los factores de transcripción IRF8, ID2 y Batf3 y de la señalización a través de Flt3 (Edelson et al., 2010); (Ginhoux et al., 2009); (Hashimoto et al., 2011); (Hildner et al., 2008). En cuanto a su papel en la inmunidad contra patógenos, en un modelo de infección viral por el virus del herpes simple se observó durante ensayos *ex vivo* que las todas las DCs migratorias, es decir, las LCs, las DC CD11b⁺ y las DCs CD103⁺ eran capaces de presentar antígenos virales a las células T CD4⁺ pero tan solo las DCs CD103⁺ tenían capacidad para la presentación cruzada de antígenos extracelulares y la activación de linfocitos T CD8⁺ (Bedoui et al., 2009). En otro modelo de leishmaniasis cutánea en el que se deplecionaron específicamente las DCs Langerina⁺ *in vivo* se produjo una activación defectuosa de los linfocitos T CD8⁺ mientras que la respuesta de los linfocitos T CD4⁺ no se vio afectada (Brewig et al., 2009).

1.1.2.pDCs

Las células dendríticas plasmacitoides (pDCs) se localizan tanto en la médula ósea, en la sangre y en el timo como en otros órganos linfoides. En reposo, presentan el siguiente fenotipo; Ly6C⁺, CD11b⁻, CD11c^{int}, Siglec-H⁺, B220⁺ y PDCA⁺ y expresan principalmente dos receptores endosomales implicados en el reconocimiento de estructuras conservadas asociadas a patógenos pertenecientes a la familia de los TLRs (del inglés *Toll like receptors*) (Colonna et al., 2004). TLR7, reconoce RNA de cadena sencilla característico de muchos genomas virales y TLR9, es capaz de reconocer secuencias ricas en CpG no metiladas presentes en el DNA bacteriano y viral (Gilliet and Lande, 2008). La activación de las células dendríticas plasmacitoides tras el reconocimiento de estos ácidos nucleicos da lugar a la producción de grandes cantidades de interferón de tipo I (IFN-I), la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-12, IL-6 y TNF α y la expresión de moléculas de coestimulación (Kawai and Akira, 2010).

Por ello, las pDCs son células productoras de IFN-I profesionales en respuestas antivirales (Liu, 2005)). Por una parte, el IFN-I activa la inmunidad innata inhibiendo directamente la replicación del virus (Pestka et al., 2004) y por otra, induce la inmunidad adaptativa aumentando la capacidad de otras DCs para la presentación cruzada de antígenos extracelulares a linfocitos T CD8⁺ e induciendo la polarización de linfocitos T CD4⁺ vírgenes hacia una respuesta Th (del inglés *T helper*) de tipo 1 (Le Bon et al., 2003); (Trinchieri, 2003). A

su vez, aumenta la función antiviral de otras subpoblaciones como las NKs o los linfocitos B (Biron, 2001); (Jego et al., 2003).

Las pDCs también están implicadas en algunas enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (SLE) y la psoriasis debido al reconocimiento del DNA o el RNA propio a consecuencia de la rotura de la tolerancia innata. En algunas de estas patologías, la formación de inmunocomplejos que contienen DNA propio conduce a la activación continuada de las pDCs y consiguiente producción de IFN-I que en último lugar provoca la activación de linfocitos T y B autorreactivos (Banchereau and Pascual, 2006); (Gilliet and Lande, 2008).

Recientemente, se ha descrito que las pDCs juegan un papel muy importante en la reparación del daño tisular. En un modelo de inflamación aguda de la dermis se ha observado una rápida infiltración de pDCs a la zona dañada y producción de IFN-I dependiente de TLR7 y TLR9, que contribuyen a la cura de la lesión (Gregorio et al., 2010); (Guiducci et al., 2008).

1.2. DCs en inflamación

En situaciones de inflamación como puedan ser las producidas por infecciones microbianas o daño tisular, se produce un gran reclutamiento de precursores y un aumento en el número total de DCs tanto en los tejidos no linfoides afectados como en los órganos linfoides drenantes (Leon et al., 2007); (Serbina et al., 2003b); (Yoneyama et al., 2001). En este sentido, los monocitos tienen un papel muy importante ya que se ha descrito que pueden ser rápidamente movilizados desde la sangre a las zonas inflamadas y diferenciarse localmente dando lugar a DCs inflamatorias. Sin embargo, la contribución de los monocitos a la generación de las distintas subpoblaciones de DCs en reposo no ha sido esclarecida totalmente.

En el modelo de leishmaniasis cutánea, las DCs dermales inflamatorias que se generan en la dermis, y que posteriormente migran a los ganglios linfáticos, muestran un fenotipo ($CD11c^{int}$, $CD11b^{+}$, $MHC-II^{hi}$, $CD4^{-}$, $CD8^{-}$) muy parecido al que tienen las DCs dermales en situación de reposo, lo cual podría indicar que esta subpoblación tiene origen monocítico. Por otro lado, durante estos procesos infecciosos, también se produce un incremento en el número de DCs residentes en los ganglios linfáticos. Esto sugiere que las DCs $CD8^{+}$ y $CD8^{-}$ se generan *de novo* en situación de inflamación aunque el precursor responsable de esta diferenciación todavía no ha sido caracterizado.

1.3. Origen de la células dendríticas

Todas las DCs, a excepción de las células de Langerhans en condiciones homeostáticas (LCs) (Schulz et al.), provienen de células madre hematopoyéticas (HSCs, del inglés haematopoietic

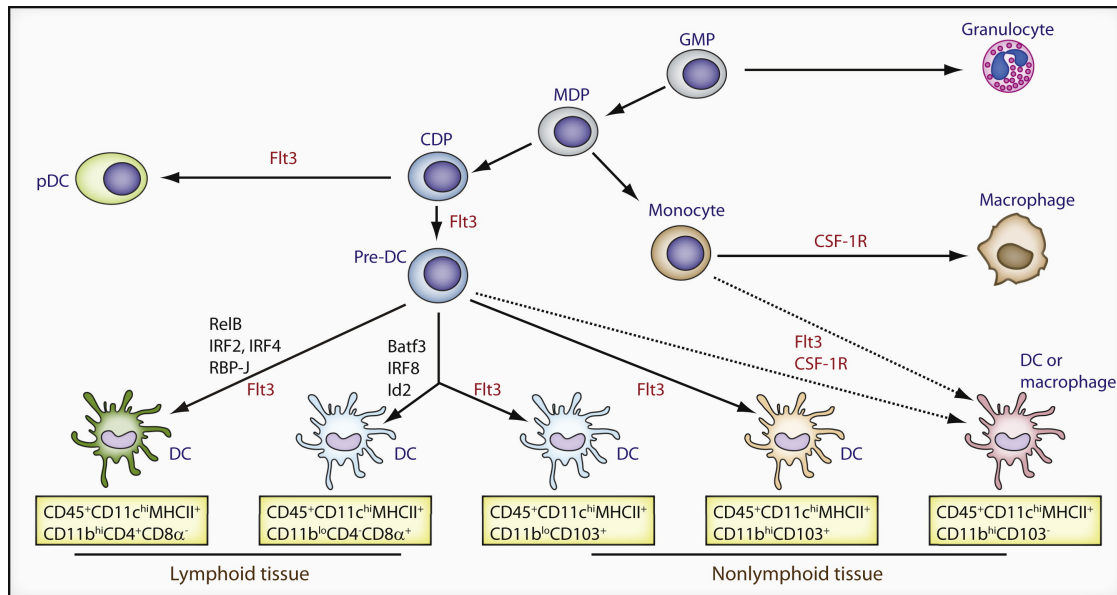
stem cells) que residen en la médula ósea. Estas HSCs dan lugar a diferentes precursores en la médula ósea que progresivamente van restringiéndose a los distintos linajes hematopoyéticos. La divergencia entre linaje linfóide y mieloide es un fenómeno muy temprano de la hematopoyesis. Un precursor común mieloide (CMP) puede dar lugar a eritrocitos, granulocitos, monocitos, macrófagos y megacariocitos, mientras que un precursor común linfóide (CLP) puede dar lugar a células B, células T y células NK (Akashi et al., 2000); (Kondo et al., 2001). Estudios iniciales de transferencia adoptiva revelaron que la fracción Flt3⁺ tanto de los precursores mieloides como de los linfoides eran capaces de generar DCs y con una eficiencia muy similar (Karsunky et al., 2003). Los CLPs son muy eficientes en la diferenciación de DCs del timo, sin embargo lo son menos que los CMPs en la generación de DCs del bazo (Manz et al., 2001); (Wu et al., 2001). Estos datos indican que aunque los CMPs son los precursores que contribuyen principalmente a la generación de DCs, no se pueda desestimar la contribución de los CLPs en según que situaciones.

Más adelante, distintos grupos describieron el papel central de la señalización del ligando de Flt3 (Flt3L) a través de su receptor, Flt3, en la diferenciación y homeostasis de las DCs en situación de reposo (D'Amico and Wu, 2003); (Waskow et al., 2008). Asimismo, se estableció la correlación entre la expresión de Flt3 en distintos precursores y el potencial para su diferenciación a DCs. Esto permitió identificar posteriormente un precursor mieloide residente en la médula ósea que ha perdido el potencial de generar eritrocitos, granulocitos y megacariocitos pero todavía puede diferenciarse en monocitos, macrófagos, DCs. Este precursor con alta tasa proliferativa, fue denominado precursor común de macrófagos y DCs (MDP) y su fenotipo es Lin⁻ Flt3⁺ c-kit⁺ CD115⁺ CX3CR1⁺ (Fogg et al., 2006), (Varol et al., 2007), (Auffray et al., 2009a).

A continuación, se describió otro progenitor presente en la médula ósea capaz de generar DCs convencionales y pDCs tanto *in vitro* como *in vivo*, pero no monocitos ni macrófagos. Este precursor también presentaba alta tasa proliferativa y fue denominado precursor común de DCs (CDP) y cuyo fenotipo es Lin⁻ Flt3⁺ c-kit^{lo} CD115^{+/-} (Naik et al., 2007); (Onai et al., 2007). Más tarde se demostraría mediante transferencia adoptiva que los CDPs derivan de los MDPs y que la diferenciación entre monocito y DC se da en la médula ósea en la diferenciación de MDP a CDP (Liu et al., 2009).

Más tarde, se caracterizó el precursor de las DCs convencionales por primera vez en el bazo. Este progenitor, al que se llamó pre-DC proviene de un CDP que ha perdido su potencial de diferenciación a pDC y cuyo fenotipo es Lin⁻ Flt3⁺ CD11C^{int} MHC-II⁻ CD43^{int} SIRPα^{int} (Liu et al., 2009); (Ginhoux et al., 2009). Las pre-DCs se generan en la médula ósea pero salen de ésta y migran a través de la sangre a los órganos linfoides secundarios y a otros tejidos periféricos donde se diferencian dando lugar a las distintas subpoblaciones de DCs convencionales. En experimentos de transferencia adoptiva se demostró que las pre-DCs aisladas de la médula

ósea, la sangre o el bazo daban lugar a las DCs $CD8^+$ y $CD8^-$ del bazo, a las DC residentes de los ganglios linfáticos y a las $CD103^+$ DCs de distintos tejidos no linfoides. En cuanto a la generación diferencial de las DCs $CD8^+$ y $CD8^-$, se ha demostrado que la fracción de pre-DCs $CD24^{hi}$ es responsable de la diferenciación de las DCs $CD8^+$, mientras que la $CD24^{lo}$ lo es de las DCs $CD8^-$ (Naik et al., 2006).



Hashimoto et al., 2011 Immunity

Figura 2. Origen de las DCs residentes en los tejidos linfoides y periféricos.

1.4. Monocitos como precursores de DCs y macrófagos

Como se ha mencionado anteriormente, los MDPs dan lugar a CDPs y a precursores de monocitos en la médula ósea. Estos precursores expresan CD115 (receptor de M-CSF) y la señalización por su ligando, M-CSF, es la vía principal implicada en la regulación de la supervivencia, proliferación y diferenciación de monocitos (Dai et al., 2002); (Sasmono et al., 2003); (Pixley and Stanley, 2004)). Bajo distintas condiciones inflamatorias, estos monocitos pueden extravasarse a la sangre y migrar a distintos tejidos por un proceso dependiente de CCR2, para generar macrófagos o DCs inflamatorias (Rivollier et al., 2012). Recientemente, se ha demostrado en un modelo de infarto de miocardio, que los monocitos también pueden ser reclutados al corazón desde el bazo, actuando éste como reservorio (Swirski et al., 2009). Si este mecanismo tiene relevancia en otros contextos inflamatorios, está todavía por determinar.

En ratón, se han descrito dos subpoblaciones de monocitos que difieren en su fenotipo, su circulación por la corriente sanguínea, su potencial de diferenciación y sus funciones (Geissmann et al., 2010). Se definen como monocitos $Ly6C^{high}$ o $Ly6C^{low}$ en base a la diferente

1.4.1. Monocitos Ly6C^{low}

Los monocitos Ly6C^{low} presentan el siguiente fenotipo; CD11b^{hi}, CCR2⁻, CX₃CR1⁺, L-selectina⁻ y CCR5⁺ y son igual abundantes en sangre que los monocitos Ly6C^{high} (Auffray et al., 2009b). Estudios de microscopía intravital han revelado que su función en estado de reposo es migrar por la zona luminal de los vasos sanguíneos mediante asociación con el endotelio vascular, proceso que se conoce como *patrolling* y que facilita su rápido reclutamiento a diferentes tejidos bajo distintos estímulos pro-inflamatorios (Auffray et al., 2007). Además diversas evidencias experimentales indican que en situación de reposo los monocitos Ly6C^{low} podrían ser precursores de otras poblaciones de DCs o macrófagos en tejidos no linfoides, ya que se ha demostrado mediante experimentos de transferencia adoptiva de monocitos que la subpoblación Ly6C^{low} da lugar a las DCs CD11b⁺ del pulmón (Jakubzick et al., 2008) y que también puede diferenciarse en macrófagos alveolares (Landsman et al., 2007) y (Landsman and Jung, 2007).

En cuanto a su papel en inflamación, se ha descrito en un modelo de infección intraperitoneal con *Listeria monocytogenes*, que los monocitos Ly6C^{low} son movilizados más rápidamente que los Ly6C^{high} al sitio de infección y participan en la respuesta temprana mediante la secreción de TNF- α . Además se ha propuesto que estos monocitos Ly6C^{low} pueden diferenciarse posteriormente a macrófagos activados de forma alternativa (Auffray et al., 2007). Así mismo, en un modelo de lesión del músculo esquelético se observó que los monocitos Ly6C^{low} diferenciados localmente exhibían características similares a los macrófagos anti-inflamatorios y promovían la miogénesis y la regeneración muscular (Arnold et al., 2007). Este papel en la reparación del daño tisular también se ha descrito en el modelo de infarto de miocardio, ya que los monocitos Ly6C^{low} reclutados en una fase tardía, producen VEGF, promoviendo la reparación de la lesión mediante la acumulación de miofibroblastos, la angiogénesis y la deposición de colágeno (Nahrendorf et al., 2010).

1.4.2. Monocitos Ly6C^{high}

Los monocitos Ly6C^{high} presentan el siguiente fenotipo; CD11b^{hi}, CCR2⁺, CX₃CR1^{low}, L-selectina⁺ y CCR5⁻ y también se les conoce como monocitos inflamatorios (Auffray et al., 2009b). Representan entre 2-5% de los leucocitos circulantes y son rápidamente movilizados a los sitios de infección e inflamación de manera dependiente de CCR2, donde condicionados por factores locales, citoquinas pro-inflamatorias y estímulos microbianos, son capaces de diferenciarse en macrófagos o DCs inflamatorias. Este reclutamiento de monocitos es esencial en el control y eliminación de infecciones virales, bacterianas o protozoarias pero también puede contribuir a la patogénesis de algunas afecciones como la aterosclerosis (Serbina et al., 2008); (Shi and Pamer, 2011).

1.4.2.1. Diferenciación a células dendríticas

Aunque la generación *in vivo* de DCs a partir de monocitos se describió originalmente en situaciones inflamatorias asociadas a procesos infecciosos, recientemente se ha propuesto que en condiciones de reposo algunas DCs presentes en tejidos no linfoides pudieran tener un origen monocítico. A este respecto, se ha demostrado que los monocitos Ly6C^{high} dan lugar a las DCs CD11b⁺ CX₃CR1⁺ de la *lamina propria* (Varol et al., 2009); (Bogunovic et al., 2009). En el pulmón, experimentos de transferencia adoptiva de monocitos, muestran las DCs CD103⁺ provienen de monocitos Ly6C^{high} (Jakubzick et al., 2008), sin embargo, otro estudio sugiere que esta subpoblación CD103⁺ deriva de pre-DCs, y que los monocitos podrían ser parcialmente, los precursores de las DCs CD11b⁺ tanto en el hígado como en el riñón (Ginhoux et al., 2009).

Como se ha comentado anteriormente, la primera demostración del potencial de los monocitos para generar DCs *in vivo* se dio en un modelo de inyección subcutánea de microesferas de látex marcadas con un fluorocromo para trazar su internalización en el foco inflamatorio. Este estudio concluyó que se producía un reclutamiento de monocitos Ly6C^{high} que se diferenciaban localmente tanto a macrófagos como a DCs para después migrar a los ganglios linfáticos drenantes (Randolph et al., 1999). Posteriormente, trabajos realizados en nuestro laboratorio fueron pioneros en la descripción de estas DCs inflamatorias diferenciadas *in vivo* a partir de monocitos Ly6C^{high} en un modelo de infección subcutánea con el parásito intracelular *Leishmania major*. Tras la transferencia subcutánea e intravenosa de estos monocitos, se observó un reclutamiento de los mismos tanto al foco de infección, en este caso la dermis, como a los ganglios poplíteos drenantes (PoLNs). Estos monocitos son capaces de diferenciarse *in situ* dando lugar a moDCs dermales y LN moDCs (del inglés *lymph node*). Además se demostró que las moDCs diferenciadas *de novo* en la dermis, eran capaces de migrar a los PoLNs y responsables de iniciar la polarización de linfocitos T CD4⁺ hacia respuestas Th1 específicas contra *L. major* (Leon et al., 2007). Asimismo, en otro estudio realizado en nuestro laboratorio, con este mismo modelo de infección, se describió que los monocitos Ly6C^{high} son reclutados a los ganglios linfáticos a través de las vénulas del endotelio alto por un proceso dependiente de la interacción entre las moléculas de adhesión L-selectina y PNAd. Del mismo modo, se demostró que su migración al foco de infección a través de las vénulas dermales es dependiente de las interacciones entre PSGL-1 y P/E-selectina y de L-selectina y PNAd (Leon and Ardavin, 2008a).

A continuación, distintos trabajos describieron la diferenciación de DCs derivadas de monocitos y su papel en la inducción de respuestas T específicas contra el patógeno, en diferentes modelos de infección. Por ejemplo, durante infección pulmonar por la levadura *Cryptococcus neoformans*. En este caso, el reclutamiento de monocitos Ly6C^{high} al pulmón, conlleva una acumulación de DCs CD11b⁺ en los ganglios linfáticos drenantes, así como un cambio en la polarización de la respuesta hacia tipo Th2 (Osterholzer et al., 2009). También durante

infección pulmonar por el hongo *Aspergillus fumigatus*, se ha demostrado que tanto los monocitos Ly6C^{high} como las DCs derivadas de monocitos participan en el transporte de las esporas del hongo hasta los ganglios linfáticos y en la activación de la respuesta T CD4⁺ específica (Hohl et al., 2009); (Rivera et al., 2011). La diferenciación de monocitos a DCs también tiene lugar durante la respuesta inmune asociada a virus. Tras infección subcutánea con el virus del herpes simple (HSV), las DCs dermales migran a los ganglios linfáticos y son reemplazadas por DCs derivadas de los monocitos Ly6C^{high} reclutados a las lesiones zosteriformes que se diferencian localmente (Eidsmo et al., 2009). Por otra parte, en un modelo de infección pulmonar por el virus de la gripe, la transferencia adoptiva de monocitos Ly6C^{high} en ratones deficientes para el receptor CCR2, promueve la eliminación del virus e induce la respuesta de la células T CD8⁺ específicas del virus (Aldridge et al., 2009). También se ha demostrado en un modelo de lesión cutánea por radiación ultravioleta, que los monocitos Ly6C^{high} son reclutados a la zona dañada, donde proliferan y se diferencian en células de Langerhans *in vivo*. Además, este proceso es dependiente de la señalización a través del receptor de M-CSF (Ginhoux et al., 2006).

1.4.2.2. TipDCs: DCs productoras de TNF- α y óxido nítrico

En lo que respecta a las infecciones bacterianas, cabe destacar la contribución de un trabajo realizado con el modelo de infección por *Listeria monocytogenes*. En él, se caracterizó por primera vez una población de DCs que participaba en la defensa innata contra *Listeria* mediante la producción de TNF- α y NO a través de la inducción de iNOS (*del inglés*, inducible nitric oxide synthase) a la que se le llamó TipDCs (Serbina et al., 2003a). Su función principal no es la presentación antigénica a células T para la inducción de una respuesta específica, si no la contribución a la inmunidad innata mediante la producción de factores solubles con actividad inflamatoria y microbicida. Además, este trabajo sugiere, que las TipDCs tienen un origen monocítico y que el reclutamiento de monocitos Ly6C^{high} a las zonas de infección, es decir, el hígado y el bazo, es dependiente de CCR2 (Serbina and Pamer, 2006). Posteriormente, se ha descrito la generación de estas TipDCs en otras infecciones bacterianas como *Brucella melitensis* donde se observan tanto en el peritoneo como en el bazo (Copin et al., 2007) y en el pulmón durante infección por *Mycobacterium tuberculosis* (Peters et al., 2004); (Skold and Behar, 2008).

Estas DCs han sido también identificadas en durante procesos infecciosos causados por protozoos, como es el caso de *Toxoplasma gondii*. En este modelo tras inoculación oral o peritoneal, los monocitos Ly6C^{high} reclutados a la lámina propia del intestino, se diferencian en células productoras de iNOS y TNF- α . Asimismo, ratones deficientes para el receptor CCR2, resultan más susceptibles a la infección debido a la retención de los monocitos en la médula ósea (Dunay et al., 2008); (Dunay et al., 2010). En el caso de infección subcutánea por el

parásito *Leishmania major*, recientemente se ha mostrado que la producción de TNF- α e iNOS es debida a DCs CD11b⁺, Ly6C⁺, CD11c⁺ que se reclutan tanto a la dermis como a los ganglios poplíteos de manera dependiente de CCR2 y que además es la población infectada principalmente (De Trez et al., 2009). Estas TipDCs derivadas de monocitos probablemente se corresponden con las LN moDCs descritas anteriormente (Leon et al., 2007). Otro ejemplo se da durante infección intraperitoneal con *Trypanosoma brucei*, se induce el reclutamiento de monocitos Ly6C^{high} al hígado, al bazo y a los ganglios mesentéricos de manera dependiente de CCR2, y consiguiente diferenciación en TipDCs. En cambio, al contrario de lo que ocurre en otros modelos, ratones deficientes para CCR2, son más resistentes a la infección y presentan menos parásitos circulantes en sangre (Guilliams et al., 2009); (Bosschaerts et al., 2010).

En lo que se refiere a la diferenciación y activación de las TipDCs, se ha demostrado en un modelo de infección por *Trypanosoma brucei*, que es un proceso que consta de tres pasos fundamentales; i) la migración de los monocitos, dependiente de CCR2 e independiente de CCR5, desde la médula ósea hasta el foco inflamatorio, ii) la diferenciación de los monocitos en DC inflamatorias inmaduras por un mecanismo independiente de IFN γ y MyD88 (del inglés *myeloid differentiation primary response gene 88*) y iii) la maduración de las DCs inflamatorias para dar lugar a DCs funcionales capaces de producir TNF- α y NO, por un mecanismo dependiente de IFN γ y MyD88 (Bosschaerts et al., 2010). Además, otro trabajo basado en el modelo de infección con *Leishmania major* propone que la activación de estas DCs inflamatorias para la producción de TNF- α y NO también depende de las moléculas CD40, IL-12, y parcialmente de TNF- α y TLR9 (De Trez et al., 2009). Por otro lado, se ha descrito que IL-10 podría actuar como un regulador negativo en la generación de TipDCs, por una parte, limitando el reclutamiento de monocitos reduciendo la expresión de CCL2 y por otra, impidiendo su diferenciación y maduración a TipDC (Guilliams et al., 2009); (Bosschaerts et al., 2010).

1.4.2.3. Diferenciación a macrófagos

En situación de reposo, los monocitos salen de la médula ósea migran a través de la corriente sanguínea, y se extravasan para repoblar los distintos órganos, incluido el bazo que pueden utilizar como reservorio, dando lugar a la mayoría de macrófagos residentes (Gordon and Taylor, 2005). En los órganos linfoides dan lugar a los macrófagos de la zona subcapsular de los ganglios linfáticos, los macrófagos de la zona marginal y la pulpa roja del bazo así como los de la médula ósea y el timo. También derivan de monocitos los macrófagos de los tejidos no linfoides, donde reciben otros nombres como las células de Kupffer en el hígado, los histiocitos en el tejido conectivo, los macrófagos alveolares del pulmón y las células de la microglía del sistema nervioso central. En ausencia de inflamación, los macrófagos están implicados en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos, y participan en un gran número de procesos

tales como la eliminación de células apoptóticas, la reparación de tejidos dañados, la eliminación de debris celular y endotoxinas de la sangre, el mantenimiento de la tolerancia de la flora intestinal y la eliminación de distintos alérgenos en el pulmón (Pollard, 2009); (Murray and Wynn, 2011).

En situación de inflamación como la generada por un proceso infeccioso, los macrófagos se activan aumentando su capacidad fagocítica e induciendo respuestas antimicrobianas mediante la secreción de mediadores pro-inflamatorios como $\text{TNF-}\alpha$, óxido nítrico e IL-1 que contribuyan a la eliminación del patógeno. Durante otros procesos inflamatorios como pueda ser el provocado por daño tisular, los macrófagos adquieren un fenotipo anti-inflamatorio caracterizado por la producción de $\text{TGF-}\beta$ y PDGF que contribuyen a la regeneración del tejido y a la reparación de la herida (Mosser and Edwards, 2008).

Se ha propuesto que los monocitos también pueden diferenciarse en macrófagos en distintos contextos inflamatorios. Recientemente, se ha descrito que durante lesiones cerebrales, como por ejemplo debidas a irradiación del tejido, los monocitos $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ son reclutados a la zona dañada son los precursores de las células de la microglía en el cerebro (Mildner et al., 2007). En un modelo de encefalitis causada durante la infección por West Nile virus, se produce un reclutamiento de monocitos $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ al cerebro dependiente de CCL2 resultando en un aumento en el número de células de la microglía e incrementando la patogénesis de la enfermedad (Getts et al., 2008). Sin embargo, posteriormente se ha demostrado que las células de la microglía se generan durante el desarrollo embrionario a partir de precursores mieloides distintos a estos monocitos inflamatorios (Ginhoux et al., 2010). Por otra parte, en situaciones inflamatorias no patogénicas como la producida durante aterosclerosis, los monocitos $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ son reclutados a las placas del ateroma de manera dependiente de los receptores CCR2, CCR5 y $\text{CX}_3\text{CR1}$ donde se diferencian a macrófagos y contribuyen a la inflamación local (Swirski et al., 2007); (Combadiere et al., 2008). Además cabe destacar que recientemente se ha descrito en un modelo de infección por helmintos, en el que la respuesta de las células T se polariza hacia un entorno $\text{T}_{\text{H}2}$, la acumulación de macrófagos en la zona infectada se debe a la proliferación *in situ* de los mismos, mediada por la IL-4 (Jenkins et al., 2011).

1.5. Factores que determinan la diferenciación de monocitos *in vivo*

GM-CSF y M-CSF fueron originalmente definidos como factores de crecimiento de células hematopoyéticas dada su capacidad para diferenciar precursores de la médula ósea *in vitro* y generar colonias de células mieloides maduras, dando lugar a granulocitos y macrófagos en el caso de GM-CSF y a macrófagos en el caso de M-CSF (Metcalf, 1986). Más tarde, se comprobó que ambas citoquinas están implicadas en la supervivencia y/o proliferación, la diferenciación y la activación de células maduras *in vitro* ampliando así sus posibles funciones

durante la respuesta inmune (Burgess and Metcalf, 1980); (Hamilton et al., 1980); (Fleetwood et al., 2005); (Chitu and Stanley, 2006).

Estudios realizados *in vitro* a partir de monocitos o precursores de la médula ósea en cultivo junto con GM-CSF, mostraron su potencial para dar lugar a células con un fenotipo similar al de las DCs inmaduras y con capacidad para presentar antígenos (Sallusto and Lanzavecchia, 1994); (Caux et al., 1996); (Fleetwood et al., 2007). Sin embargo, sorprendentemente trabajos realizados posteriormente en ratones deficientes en el receptor de GM-CSF o su ligando, no presentaban defectos en la generación de DCs en los órganos linfoides (Vremec et al., 1997) aunque padecen proteinosis alveolar pulmonar, debido a una incorrecta maduración de los macrófagos alveolares (Stanley et al., 1994); (Robb et al., 1995), así como una reducción en el número de eosinófilos (Nishinakamura et al., 1995). Estudios más recientes utilizando estos mismos ratones, han descrito que GM-CSF es necesario en la generación de la población de DCs CD11b⁺ (Varol et al., 2009) y la población de DCs CD103⁺ (Bogunovic et al., 2009) de la lámina propia y las DCs CD103⁺ de la dermis en condiciones homeostáticas (King et al., 2010). Asimismo, GM-CSF ha sido implicado en la diferenciación de las DCs inflamatorias que se acumulan en distintos tejidos en un modelo de artritis inducida por colágeno (Campbell et al., 2011) y en un modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) (King et al., 2010). Por el contrario, un trabajo reciente, propone que la señalización a través del receptor de GM-CSF es necesaria para la generación de las DCs residentes en los tejidos no linfoides en situación de reposo mientras que la generación de DCs inflamatorias en distintos modelos de infección aguda es independiente de GM-CSF pero dependiente de M-CSF (Greter et al., 2012a).

Por otro lado, estudios realizados *in vitro* a partir de monocitos diferenciados en presencia de M-CSF, daban lugar a células con un fenotipo similar al de los macrófagos y con propiedades fagocíticas (Fleetwood et al., 2007). Posteriormente, se describió que M-CSF es un factor esencial en la generación, desarrollo y diferenciación del linaje fagocítico mononuclear, entre los que se encuentran los monocitos y los macrófagos titulares (Chitu and Stanley, 2006); (Hamilton, 2008). Los ratones *Csf1^{op}/Csf1^{op}* portan una mutación espontánea que inactiva el gen *Csf1* que codifica la proteína M-CSF, lo que se traduce en una deficiencia en el número de macrófagos en distintos tejidos incluyendo los osteoclastos, dando lugar a osteopetrosis entre otros defectos (Yoshida et al., 1990); (Cecchini et al., 1994). Los ratones deficientes en el gen que codifica el receptor de M-CSF (también conocido como CD115) presentan incluso un fenotipo más grave (Dai et al., 2002), ya que carecen de las LCs de la epidermis y de la microglia (Ginhoux et al., 2006); (Ginhoux et al., 2010). Estas diferencias entre los dos fenotipos sugerían la existencia de otro ligando específico del receptor. IL-34 fue identificado como otro ligando del receptor de M-CSF (Lin et al., 2008), con funciones complementarias a las de M-CSF (Wei et al., 2010). Recientemente, diversos trabajos han explorado su función *in vivo* mediante la generación de ratones deficientes en la citoquina, y han descrito que IL-34 es

necesaria para el desarrollo embrionario de la LCs pero no para el de la microglia, y que es crucial para la homeostasis de ambas poblaciones en la edad adulta (Wang et al., 2012); (Greter et al., 2012b). Muy pocos trabajos han abordado el papel *in vivo* de ambas citoquinas GM-CSF, M-CSF y sus receptores en el control de la diferenciación de monocitos a DCs o macrófagos respectivamente, tanto en homeostasis como en situación de inflamación (King et al., 2009); (MacDonald et al., 2010). Además la ausencia de estudios comparativos hace que la función de ambas citoquinas tanto en reposo como durante procesos infecciosos en los que el reclutamiento y diferenciación de monocitos resulta crucial, quede todavía por determinar.

Tal y como se ha detallado anteriormente, estudios previos realizados en nuestro laboratorio, demostraron el potencial de los monocitos para generar moDCs *in vivo* durante la respuesta inmune contra el parásito *L. major* (Leon et al., 2007). Sin embargo, hay cuestiones que continúan sin estar completamente esclarecidas y que resultan muy controvertidas, como por ejemplo, el origen y la función de las distintas subpoblaciones de DCs generadas durante un proceso infeccioso, los factores que determinan la diferenciación *in vivo* de los monocitos a DCs, el potencial de los monocitos para la generación de macrófagos *in vivo* en situaciones de inflamación o el recambio celular de monocitos, DCs y macrófagos mediante proliferación *in situ* durante procesos infecciosos. Por este motivo, decidimos utilizar este modelo de infección, ya establecido en nuestro laboratorio, para tratar de esclarecer algunas de estas cuestiones.

2. LEISHMANIA MAJOR

La leishmaniasis está causada por el parásito protozoario del género *Leishmania* y se transmite por la picadura de las hembras de los mosquitos pertenecientes a los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* (Killick-Kendrick, 1990). La leishmaniasis es una de las enfermedades tropicales más importantes de la que ya existen unos 12 millones de casos en todo el mundo; 350 millones de personas están en riesgo de contraer alguna de sus formas clínicas y que provoca alrededor de 70.000 muertes al año (Murray et al., 2005).

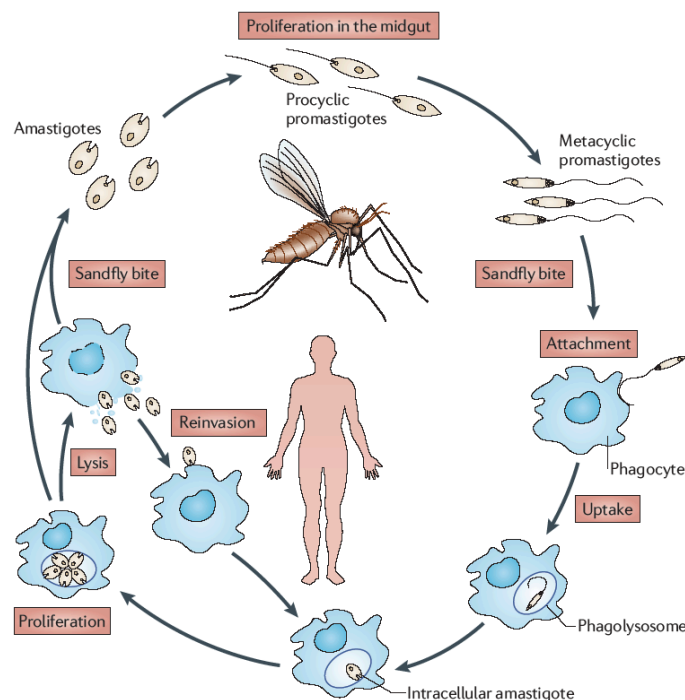
Algunas especies de *Leishmania*, como *L. major*, *L. tropica*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, cursan con leishmaniasis cutánea y mucocutánea, que se caracteriza por la aparición de úlceras y llagas en la piel o las mucosas, localizadas o difusas, que pueden curarse espontáneamente o permanecer de manera crónica dependiendo de la respuesta inmune del hospedador. La forma más virulenta de la enfermedad es la llamada leishmaniasis visceral causada por las especies *L. donovani* y *L. infantum*, que se disemina a distintos órganos, en especial el hígado, el bazo y la médula ósea y produce fiebre, hepato-esplenomegalia, anemia y desnutrición.

Leishmania es un parásito intracelular obligado que infecta principalmente a las células del sistema fagocítico mononuclear, es decir, monocitos, macrófagos y células dendríticas. Su entrada a estas células hospedadoras está mediada por distintos receptores. En la dermis, los

macrófagos residentes fagocitan los promastigotes de *L. major* a través del receptor 3 del complemento (CR3), inactivando las células infectadas y permitiendo así su replicación en el sitio de infección (Mosser and Edelson, 1985); (Schonlau et al., 2000). Sin embargo, en el caso de las DCs, la internalización del parásito se produce a través de los receptores FcγRI y FcγRIII y es dependiente de la producción de IgGs para la opsonización de los parásitos (Woelbing et al., 2006). Una vez internalizado, el parásito puede inhibir de manera activa la respuesta inmune del hospedador y modula el microambiente promoviendo la producción de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF-β e inhibiendo la producción de IL-12, óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno para favorecer su replicación y diseminación (Mougneau et al., 2011).

2.1. Ciclo de vida del parásito *Leishmania*

Leishmania es un parásito intracelular que presenta dos morfologías durante su ciclo vital. Las formas alargadas, flageladas y móviles del parásito se llaman promastigotes procíclicos que residen en el intestino del mosquito donde tras distintas etapas de diferenciación se transforman en promastigotes metacíclicos que es la forma infectiva y no replicativa del parásito (Sacks and Kamhawi, 2001). Éstos migran a la válvula faríngea y son inoculados al hospedador durante la picadura del mosquito junto con proteofosfoglicanos derivados del parásito y otros componentes de la saliva que modulan el microambiente para favorecer la supervivencia del parásito. Tras su inoculación en la dermis, los promastigotes metacíclicos son fagocitados por las células presentes en el entorno como son los neutrófilos, los macrófagos residentes y las células dendríticas.



Kaye et al., 2011 Nat Rev Microbiol

Figura 4. Ciclo vital del parásito *Leishmania* sp.

En el interior de la célula, estos promastigotes metacíclicos se diferencian en amastigotes que se caracterizan por su forma redondeada y no flagelada, y comienzan a replicarse hasta ocasionar la lisis de la célula infectada liberándose al medio extracelular. Estos amastigotes se unen a las inmunoglobulinas G del hospedador formando inmunocomplejos que son fagocitados por otras células a través de su receptor $Fc\gamma$ (Miles et al., 2005). *Leishmania* modula diferentes vías de señalización de la célula infectada para favorecer su replicación intracelular facilitando de esa manera la invasión de nuevas células y diseminando la infección a otros tejidos. El ciclo se completa cuando estas células fagocíticas infectadas son captadas junto con la sangre durante la picadura de otro mosquito; una vez en el intestino los amastigotes son liberados y comienzan de nuevo su diferenciación a promastigotes procíclicos.

2.2. Inmunidad innata contra *Leishmania major*

Clásicamente se ha considerado que los macrófagos eran las principales células diana de este patógeno intracelular, sin embargo distintos estudios han demostrado, tanto *in vitro* como *in vivo*, que el rango de células hospedadoras es mucho más amplio, incluyendo células hematopoyéticas y no hematopoyéticas como los fibroblastos.

En este sentido, se ha observado que promastigotes de *L. major* son rápidamente fagocitados por neutrófilos *in vitro* pero son capaces de sobrevivir dentro del fagosoma. Estos neutrófilos infectados inducidos a entrar en apoptosis son fagocitados a su vez por macrófagos añadidos al cultivo, que al ser una internalización mediada por receptores evita la activación de cualquier mecanismo de defensa y transfiriere los promastigotes intactos al fagosoma del macrófago (Ravichandran and Lorenz, 2007); (Laskay et al., 2003). Por este motivo, se ha sugerido que los neutrófilos puedan actuar como caballos de Troya favoreciendo el establecimiento de la infección. Además, mediante microscopía de excitación de dos fotones se ha demostrado que durante infección por *L. major*, los neutrófilos son rápidamente reclutados al sitio de inoculación y que son infectados por el parásito *in vivo* durante las etapas tempranas de la infección (Peters et al., 2008). Un trabajo reciente, muestra que estos neutrófilos infectados son capturados por las DCs dermales lo que resulta en la inhibición de la respuesta inmune específica contra el parásito (Ribeiro-Gomes et al., 2012).

Aunque los neutrófilos participan activamente en las primeras etapas de la infección, son las células fagocíticas en las que *Leishmania* se replica y en las que reside de manera latente tras la resolución de la infección. En concreto, se ha observado mediante experimentos de microscopía de excitación de dos fotones, que en la dermis del ratón, tras inoculación de *Leishmania major*, las DCs dermales capturan el parásito durante las primeras horas de infección en un proceso dinámico que implica la extensión de pseudópodos (Ng et al., 2008). Los macrófagos residentes de la dermis también son rápidamente infectados, siendo la

población dominante 24 horas tras la infección (Peters et al., 2008), sin embargo, el mecanismo de captura *in vivo* sigue siendo desconocido. Tampoco se ha esclarecido si estas DCs y macrófagos pueden transportar los parásitos desde el foco de infección a los ganglios linfáticos drenantes y participar en la inducción de la inmunidad adaptativa. Un mecanismo que ha sido propuesto se basaría en la inhibición de la maduración de los endosomas tardíos de las DCs que han internalizado el parásito de *L. major*. De esta manera, el parásito impide el reclutamiento de la GTPasa RAB7 evitando así la fusión de los endosomas tardíos con los lisosomas, y asegurándose su viabilidad y posterior transporte hasta los ganglios linfáticos (Korner et al., 2006).

Por otro lado, como se ha comentado anteriormente, durante estos procesos infecciosos e inflamatorios se produce un fuerte reclutamiento de monocitos y otros precursores. A este respecto, se ha propuesto que este reclutamiento al sitio de infección durante infección por *L. major* podría estar regulado por los neutrófilos mediante la secreción de CCL3 (Charmoy et al., 2010). Otra hipótesis está basada en la activación del complemento debido a la potente respuesta inmune inducida en la dermis tras la inoculación del parásito. A continuación se produce una gran acumulación de plaquetas en la zona, que secretan PDGF (del inglés *platelet derived growth factor*) estimulando la producción local de CCL2 por fibroblastos y otras células intersticiales y creando un gradiente de esta quimioquina que haría migrar a los monocitos desde la médula ósea hasta la dermis (Goncalves et al., 2011).

De nuevo, cabe destacar la contribución de estudios previos realizados en nuestro laboratorio en los que en este mismo modelo de infección demostraron que los monocitos reclutados al sitio de infección se diferencian *in situ* en DCs dermales, que secretan IL-12, citoquina esencial en la inducción de respuestas protectoras de tipo T_{H1} (Leon et al., 2007); (De Trez et al., 2009). Por otra parte, se ha visto que ratones deficientes en el receptor de quimioquinas CCR2, necesario para la extravasación de monocitos de la médula ósea a la sangre, desarrollan una respuesta no protectora de tipo T_{H2} durante infección por *L. major* (Sato et al., 2000). Sin embargo, también se ha sugerido, que estas DCs derivadas de monocitos al estar altamente infectadas, puedan contribuir a la progresión de la lesión (De Trez et al., 2009). Por todo ello, el papel de esta subpoblación queda todavía por determinar.

2.3. Inmunidad adaptativa contra *Leishmania major*

Las células hospedadoras del parásito *Leishmania* descritas anteriormente, juegan un papel fundamental en la unión entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa contra el mismo. Debido a esto, la mayoría de los trabajos se han centrado en definir cuales son los mediadores celulares responsables de la inducción de la respuesta inmune adaptativa.

Los ganglios linfáticos que drenan el sitio de infección son esenciales en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa contra el parásito. Una respuesta efectiva y protectora contra *Leishmania* se basa en la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ hacia un entorno T_{h1}, capaz de inducir respuestas proinflamatorias y citotóxicas mediante la producción IFN- γ y/o TNF- α y esencial en la activación de macrófagos y DCs para la eliminación del patógeno a través de la secreción de mediadores microbicidas como óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno. A este respecto, las DCs juegan un papel muy importante no sólo en el procesamiento y presentación antigénica a las células T CD4⁺, si no también a través de la secreción de citoquinas como IL-12 e interferón de tipo I promoviendo la polarización de las células T_{h1} (Woelbing et al., 2006); (Filippi et al., 2003). Esto se da en cepas de ratones genéticamente resistentes a la infección, como por ejemplo en ratones con fondo C57BL/6 (Malherbe et al., 2000). Sin embargo, en cepas genéticamente susceptibles, como es el caso del fondo Balb/c, la respuesta de las células T se polariza hacia un entorno de tipo T_{h2} debido a la secreción de citoquinas como IL-4, IL-5 y IL-13.

Por el contrario, el papel de los linfocitos T CD8⁺ durante leishmaniasis cutánea no ha sido bien definido. En un modelo de infección con una dosis baja del parásito, las células T CD8⁺ resultan esenciales en la resolución de la infección primaria (Belkaid et al., 2002), debido en parte a la capacidad del INF- γ para inducir la polarización de respuestas T_{h1} (Uzonna et al., 2004). Como se indica anteriormente, las DCs derivadas de monocitos que infiltran la lesión son importantes para la inducción de respuestas tipo T_{h1} por las células T CD4⁺ en infección por *L. major*. Sin embargo, más tarde se describió que la activación de las células T CD8⁺ en este mismo modelo, es dependiente de las DCs dermales que expresan langerina, ya que la depleción de estas últimas disminuía la respuesta de las células T CD8⁺ sin afectar la respuesta de las CD4⁺ (Brewig et al., 2009).

OBJETIVOS

Estudios previos realizados en este laboratorio utilizando el modelo de infección subcutánea por el parásito *Leishmania major*, pusieron de manifiesto el potencial que presentan los monocitos como precursores de células dendríticas *in vivo* y que esta diferenciación se producía de forma local en los distintos focos inflamatorios. Así mismo, se describió como en particular las DCs diferenciadas a partir de monocitos reclutados a la dermis, son la principales responsables de la inducción de la respuesta T CD4⁺ de tipo Th1 específica contra el parásito en ratones resistentes a la infección. Sin embargo, continúan sin estar esclarecidas muchas de las cuestiones que conciernen a la diferenciación de estas DCs inflamatorias. Por ese motivo, decidimos utilizar este modelo ya establecido en nuestro laboratorio para abordar los siguientes objetivos:

- I) Contribución de los monocitos a la generación de las distintas subpoblaciones de DCs inflamatorias presentes tanto en la dermis como en el PO-LN durante la respuesta inmunológica inducida por la infección con *Leishmania major* mediante el uso de ratones deficientes para el receptor CCR2.
- II) Origen de las DCs dermales presentes en el PO-LN de ratones infectados por *Leishmania major* mediante el análisis de ratones deficientes para el receptor de CCR2, el estudio del grado de infección, el análisis de su capacidad de migración al PO-LN y el estudio del estado de proliferación de dicha subpoblación.
- III) Factores implicados en el proceso de diferenciación de monocitos a DCs durante la infección con *Leishmania major* mediante el uso de ratones deficientes para el receptor de GM-CSF, bloqueo de la señalización a través de IL-3 y ratones deficientes para el receptor Flt3.
- IV) Análisis de la diferenciación de macrófagos durante la infección con *Leishmania major*.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES BIOLÓGICOS

1.1. Ratones

Los ratones de las cepas C57BL/6 fueron suministrados por Harlan (Bicester, UK).

Los ratones de la cepa CCR2 KO en fondo genético C57BL/6 fueron cedidos por el Dr. Frank Tacke del RWTH-University Hospital Aachen, Aachen, Germany.

Los ratones de la cepa GM-CSFR KO en fondo genético C57BL/6 fueron cedidos por el Prof. Don Metcalf del Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Parkville, Australia.

Los ratones de la cepa FLT3 KO en fondo genético C57BL/6 fueron cedidos por la Dra. Ewa Sitnicka del Lund Research Center for Stem Cell Biology and Cell Therapy, Lund, Sweden.

Todos los animales fueron mantenidos bajo condiciones libres de patógenos. En la experimentación se utilizaron animales de edades comprendidas entre las 8 y 12 semanas y se respetaron las recomendaciones europeas sobre ética de experimentación animal durante los procesos de cría, manipulación y sacrificio.

1.2. Líneas celulares y patógenos

Las líneas de hibridoma utilizadas para la producción de anticuerpos monoclonales de ratón (purificados, biotinilados o fluoresceinados) se encuentran reflejados en la Tabla 1. Las cepas de *Leishmania major* salvaje (WHOM/IR/173) y roja fluorescente (WHOM/IR/13 DsRed⁺) fueron cedidas por Dr. Nicolas Glaichenhaus, del Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Nice, France.

2. REACTIVOS

2.1. Medios de cultivo

Para el cultivo de los hibridomas, así como para los cultivos primarios de monocitos se empleó medio RPMI 1640 suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 2 µM de L-glutamina, 50 µM de 2β-mercaptoetanol, 1 mM de sodio piruvato, todos de Invitrogen (Carlsbad, CA) suplementado con un 10% de suero fetal de ternera (FCS, del inglés, fetal calf serum) de Harlan (Sera-Lab, UK). Para el cultivo del parásito *Leishmania major* se empleó medio para células de insecto Schneider's Drosophila Medium suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 50 µM de 2β-mercaptoetanol y un 20% de suero fetal de ternera (FCS) de Harlan (Sera-Lab, UK).

2.2. Anticuerpos monoclonales

Los mAbs utilizados en este trabajo se resumen en la Tabla 1. Algunos mAbs fueron purificados con columnas de proteína G-sefarosa (Amersham Bioscience) siguiendo las instrucciones de la casa comercial a partir del sobrenadante del cultivo de los hibridomas. El resto de mAbs fueron adquiridos en distintas casas comerciales en forma purificada o conjugada con biotina, FITC (isotiocinato de fluoresceína), PE (ficoeritrina), APC (aloficocianina) o PerCP (peridina de clorofila-a).

Citometría de flujo/aislamiento de poblaciones celulares		
Especificidad	Molécula conjugada	Clon
CD3	purificado/biotina	KT3
CD4	biotina	GK1.5
CD8 α	biotina/FITC	53-6.72
CD9	biotina	KMC8
CD11b	biotina/FITC/PE	M1/70
CD11c	biotina/APC	N418
CD16/32 (Fc γ RII/III)	purificado	2.4G2
CD19	purificado/biotina	1D3
CD24	purificado/biotina	M1/69
CD40	purificado/biotina	FGK45
CD43	purificado/biotina	S7
CD45.2 (Ly5.2)	biotina	ALI-4A2
CD45R (B220)	biotina/FITC	RA3-6B2
CD49b	biotina/PE	DX5
CD62L	biotina	MEL-14
CD69	biotina	H.1.2F3
CD86	biotina/PE	GL-1
CD90.2 (Thy1.2)	purificado/PE	AT15
CD103	biotina	M290
CD115 (MCSFR)	biotina	AFS98
CD172 α (Sirp- α)	PE	P84
CD197 (CCR7)	biotina	4B12
CD209b (SIGNR1)	biotina	22D1
EpCAM	biotina	G8.8
F4/80	biotina	31-A3-1
Ly-6C	biotina/FITC	HK1.4
Ly-6G	biotina/PE	1A8
MHC-II	purificado/biotina	FD11-54.3
MHC-II	FITC	2G9
MHC-II	PE	MS 11415.2

3. METODOLOGÍA

3.1. Preparaciones celulares

3.1.1. Suspensiones celulares de médula ósea

La obtención de células de médula ósea se realizó a partir del fémur y la tibia, mediante la inyección de tampón fosfato salino (phosphate buffered saline, PBS) a través del canal medular. De la suspensión celular obtenida se eliminaron los eritrocitos

mediante lisis, durante 30 segundos a temperatura ambiente, con un buffer de lisis eritrocitario compuesto por cloruro amónico (Panreac). Después se filtro a través de una malla de 45 μ m, y se lavó dos veces con PBS suplementado con 5 mM EDTA (Panreac, Barcelona, España) y un 3% de FCS.

3.1.2.Suspensiones celulares de sangre

Tras el sangrado del ratón, se trató la suspensión varias veces con un tampón de lisis eritrocitaria que contenía cloruro amónico (Panreac) y se lavaron en PBS con 3% FCS y 5 mM EDTA.

3.1.3.Suspensiones celulares de ganglios linfáticos y dermis

Se prepararon suspensiones celulares a partir de ganglios linfáticos periféricos (poplíteos y auriculares), y de tejidos derivados de la dermis de la almohadilla plantar de ratones infectados con *Leishmania major*, para la caracterización de las poblaciones presentes, especialmente monocitos y DC. Los órganos y tejidos fueron cortados en pequeños trozos y digeridos con 0,5 mg/ml Colagenasa A (Roche, Mannheim, Alemania) y 40 mg/ml de Dnasa I (Roche) en medio RPMI suplementado con un 3% FCS durante 10 minutos (ganglios linfáticos) o 40 minutos (dermis) a 37°C. Los fragmentos digeridos se disgregaron mecánicamente y se hicieron pasar a través de un filtro de 40 μ m (BD Biosciences, San Diego, CA). Las suspensiones celulares obtenidas fueron lavadas dos veces en PBS con 3% FCS, 5 mM EDTA y 5 mg/ml Dnasa I.

A continuación, para eliminar células muertas y restos de tejido, se realizó una centrifugación en un gradiente de densidad con Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) a 700g, durante 30 minutos. Se recogieron las células de la interfase y se lavaron en PBS con 3% FCS y 5 mM EDTA. La suspensión celular procedente de la cavidad peritoneal, se obtuvo después de realizar varios lavados con PBS con una jeringa y una aguja de 25G. Todas las suspensiones celulares se resuspendieron en PBS con 3% FCS y 5 mM EDTA para los sucesivos pasos de enriquecimiento, purificación o tinción celular para citometría de flujo o microscopía que se detallan continuación.

3.1.4.Fracciones celulares enriquecidas en DCs

Las suspensiones celulares procedentes de los ganglios linfáticos de los ratones infectados con *Leishmania major* fueron enriquecidas en células derivadas de monocitos y DCs mediante la depleción de células B, células T, células NK y neutrófilos por métodos inmunomagnéticos. Se incubaron primero con mAb anti-CD19, anti-CD3, anti-CD49b y anti-Ly6G, todos ellos conjugados con biotina, y después con microesferas conjugadas con estrepto-avidina (MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania).

3.2. Aislamiento de poblaciones celulares

3.2.1. Aislamiento de monocitos

Los monocitos fueron aislados mediante selección negativa a partir de suspensiones celulares de médula ósea tratadas con tampón de lisis eritrocitaria. Se deplecionaron las células T, células B, DC, granulocitos, neutrófilos y células NK utilizando esferas magnéticas conjugadas con anti-IgG de rata (Dyna-Invitrogen), a una relación esfera:célula de 7:1, después de la incubación con mAbs anti-CD90.2, B220, MHC-II, CD43 y CD24. Después de la depleción inmunomagnética, las preparaciones tenían una pureza superior al 90%. Para algunos experimentos de cocultivo o transferencia, se obtuvieron preparaciones de monocitos altamente purificadas, con una pureza superior al 98%, mediante enriquecimiento posterior por incubación con mAb anti-CD11b unido directamente a las microesferas (MACS) y consiguiente selección positiva por métodos inmunomagnéticos.

3.2.2. Aislamiento de DCs de los cultivos de moDCs

Se purificaron por selección positiva las DCs utilizando métodos inmunomagnéticos, mediante incubación secuencial con mAb anti-CD11c conjugado con biotina y microesferas conjugadas con estrepto-avidina (MACS).

3.2.3. Aislamiento de monocitos de los cultivos de moDCs

Se purificaron por selección positiva los monocitos utilizando métodos inmunomagnéticos, mediante incubación secuencial con mAb anti-CD11b conjugado con biotina y microesferas conjugadas con estrepto-avidina (MACS).

3.3. Cultivos celulares

3.3.1. Mantenimiento de los cultivos de *Leishmania major*

Los promastigotes de *Leishmania major* se crecieron en anaerobiosis, en una estufa a 26°C, en botellas de cultivo de 25 cm², con un volumen inicial de 20 ml y se mantuvieron en cultivo durante 5-6 días hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento. Para preservar la infectividad de los parásitos, se realizaron pases *in vivo* mediante infecciones periódicas en ratones Balb/c, obteniéndose las formas infectivas a partir del cultivo de los homogeneizados de los ganglios linfáticos. Tras la obtención en cultivo de promastigotes en fase exponencial, los parásitos se congelaron en nitrógeno líquido. En el manejo de los cultivos de parásitos se emplearon siempre técnicas estériles y se tuvieron en cuenta las precauciones indispensables según la normativa europea vigente para el cultivo de agentes patógenos.

3.3.2.Diferenciación de DCs y Mφ derivados de monocitos

Los monocitos aislados a partir de médula ósea de ratón se cultivaron durante 24 o 48 horas, en placas de 24 pocillos, a una concentración de $0,15 \times 10^6$ células/ml en medio RPMI al 10%FCS en presencia de 20 ng/ml de GM-CSF (Peprotech, Rocky Hill, NJ) o 20 ng/ml de M-CSF (Peprotech).

3.3.3.Diferenciación de DCs *in vitro* en presencia de promastigotes o amastigotes de *Leishmania major*

Para estudiar el efecto de *Leishmania major* en la diferenciación de DCs a partir de monocitos, los monocitos purificados de la médula ósea de ratones C57BL/6 fueron cultivados a una concentración de $0,15 \times 10^6$ células/ml durante 24 o 48 horas, en placas de 24 pocillos en medio RPMI al 10%FCS en presencia de 20 ng/ml GM-CSF, 20 ng/ml M-CSF, promastigotes o amastigotes de *Leishmania major*, a una relación parásito/monocito de 3:1 o combinación de estos estímulos. Al cabo de este tiempo, las células se analizaron fenotípicamente por citometría de flujo.

3.4. Microscopía óptica

Las suspensiones celulares citocentrifugadas sobre portaobjetos a una velocidad de 600 r.p.m durante 10 minutos, fueron analizadas utilizando un microscopio óptico Leica Leitz DMRB equipado con una cámara digital Olympus DP70.

3.5. Microscopía confocal

El análisis por inmunofluorescencia de monocitos y moDCs diferenciados en presencia de *Leishmania major* tras la separación de las distintas poblaciones mediante métodos inmunomagnéticos, se realizó sobre portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina (Sigma).

El marcaje por inmunofluorescencia se llevó a cabo en cámara húmeda. En primer lugar, los portaobjetos se incubaron con 0,5 mg/ml de poli-L-lisina durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron los portaobjetos con PBS y se añadieron las suspensiones celulares en RPMI al 0,5% FCS y se incubó de 1 a 2 horas a 37°C. Seguidamente, las células se fijaron con paraformaldehído (Merck) al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente, y después se lavaron de nuevo con PBS 150 mM NaCl (Prolabo, VWR, Leuven, Bélgica). Posteriormente, se bloquearon las preparaciones con una solución de bloqueo (1% BSA (Sigma), 0,1% goat serum, 0,05% Tween-20 (Merck), 50 mM NaCl en PBS) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

En esta misma solución de bloqueo se prepararon los anticuerpo primarios y secundarios contra las moléculas de interés. Se incubaron las preparaciones durante 20 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo primario, en este caso anti-CD11b, anti-Ly6C o anti-MHC-II. Después de lavar con la solución de bloqueo, se incubaron durante 20

minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-rat IgG Alexa 647, anti-rat Alexa 488 o anti-neutraavidina Alexa 488. Por último, los portaobjetos se montaron poniendo un cubre utilizando Fluoromount-G (SouthernBiotech) para su posterior análisis por microscopía confocal.

Las preparaciones se analizaron utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM 510 META. La lista completa de los anticuerpos para microscopía confocal utilizados en este trabajo se encuentra recogida en la Tabla 2.

Microscopía confocal		
Especificidad	Número de catálogo	Procedencia
CD68		
CD169	MCA884GA	AbD Serotec
Goat anti-hamster IgG Cy3	107-166-142	Jackson
Goat anti-rat IgG Alexa 488	A11006	Molecular Probes
Neutravidin Alexa 488	S11223	Molecular Probes

3.6. Tinción GIEMSA

Se analizó la morfología de los eosinófilos realizando una tinción Giemsa sobre cytopspins de las células Siglec-F⁺ aisladas de la dermis tras su separación celular por citometría de flujo. Las preparaciones se incubaron durante 10 minutos con el reactivo Giemsa-Wright concentrado (Sigma) y otros 10 minutos con el reactivo Giemsa-Wright diluido en agua. Posteriormente, se lavaron con agua destilada hasta eliminar el exceso de colorante; por último, se dejaron secar completamente antes de su análisis bajo un microscopio óptico.

3.7. Ensayos *in vivo*

3.7.1. Infección *in vivo* con promastigotes de *Leishmania major*

Los ratones fueron inyectados con 2×10^6 promastigotes de *Leishmania major* en fase estacionaria de crecimiento, en 50 μ l de PBS, subcutáneamente, en la almohadilla plantar de la extremidad posterior derecha, con una aguja de 29G o con 10^6 promastigotes de *Leishmania major* en fase estacionaria de crecimiento, en 20 μ l de PBS, intradérmicamente, en la oreja. Todos los experimentos fueron realizados en conformidad con la normativa institucional y aprobados por el comité local de experimentación animal.

3.7.2. Tratamiento con mAb anti-mouse IL3

Los ratones C57BL/6 o GM-CSFR KO infectados 2 días antes con *Leishmania major* en la almohadilla plantar, fueron tratados durante seis días consecutivos con 40

μg/ratón del mAb anti-IL3 o su correspondiente control de isotipo anti-IgG1 (Biolegend, San Diego, CA), administrado intraperitonealmente. La dermis y los ganglios poplíteos se analizaron el día 9 después de la infección con el parásito.

3.7.3.Tratamiento con mAb anti-MCSF-R

Los ratones C57BL/6, infectados 2 semanas con *Leishmania major* en la almohadilla plantar, fueron tratados cada dos días, hasta la semana 4 de infección, con 200 μg/ratón del mAb anti-MCSF-R o su correspondiente control de isotipo, administrado intraperitonealmente. La dermis, los ganglios poplíteos, y las células de la cavidad peritoneal se analizaron en la semana 4 después de la infección con el parásito.

3.7.4.Sensibilización de la dermis para detectar la migración de DCs

Los ratones C57BL/6 o CCR2 KO, infectados 3 semanas antes en la oreja con *Leishmania major*, fueron sensibilizados con una solución de FITC (del inglés *fluorescein isothiocyanate isomer I*, Sigma) al 1% de concentración final disuelto en una mezcla 1:1 (vol:vol) de dibutil-ftalato (Sigma) y acetona (Merck). La solución fue aplicada en la cara externa de la oreja con ayuda de un hisopo. A las 16 horas tras la aplicación, se analizaron los ganglios auriculares.

3.7.5.Análisis de la proliferación de las subpoblaciones de DCs mediante incorporación de BrdU

Los ratones C57BL/6, sin infectar o infectados 3 semanas antes con *Leishmania major* en la almohadilla plantar, fueron inyectados con 1 mg/ratón de BrdU (del inglés *5-bromo-2'-deoxyuridine*, Sigma) intraperitonealmente. A las 4, 16 o 36 horas tras la inyección, se analizó la proliferación de las distintas subpoblaciones de DCs tanto la dermis como los ganglios poplíteos mediante el kit comercial FITC BrdU Flow Kit (BD Pharmingen, San Jose, CA) siguiendo las instrucciones de la casa comercial y tras la incubación con el anticuerpo anti-BrdU-FITC (BD Pharmingen) para su detección por citometría de flujo.

3.7.6.Transferencia de monocitos en ratones infectados con *Leishmania major*

Los monocitos fueron aislados de la médula ósea de ratones C57BL/6, y fueron purificados mediante incubación con mAb anti-CD11b unido directamente a las microesferas (MACS) y consiguiente selección positiva por métodos inmunomagnéticos. A continuación, fueron marcarlos con la sonda intracelular fluorescente carboxifluoresceína (CFSE del inglés *carboxifluorescein succinimidyl ester*, Molecular Probes, Invitrogen, Oregon, USA) a una concentración 1 μM, durante 20 minutos a 37°C. Unos 7×10^6 monocitos fueron inyectados intravenosamente en ratones C57BL/6 y CCR2 KO previamente infectados, 12 días o 4 semanas antes, con *Leishmania major* en la almohadilla plantar. Las células derivadas de los monocitos

transferidos, fueron analizadas a las 12, 24 o 72 horas mediante citometría de flujo, en la dermis infectada y los ganglios linfáticos.

3.8. Citometría de flujo

Todas las tinciones se realizaron incubando primero con los mAbs biotinilados diluidos en PBS 5 mM EDTA suplementado con 3% FCS, durante 20 minutos, en un volumen de 30 μ l por cada 10^6 células, a 4°C y en oscuridad. Posteriormente, se incubaron con otra capa de anticuerpos conjugados directamente con diferentes fluorocromos (FITC, PE y APC) junto con la estreptoavidina conjugada con PerCP (BD Pharmingen), que se une a los anticuerpos biotinilados; esta incubación se realizó en el mismo tampón durante 15 minutos a 4°C y en oscuridad.

En todas las tinciones los receptores de la fracción constante de las inmunoglobulinas (FcR) fueron bloqueados previamente con mAb purificados anti-Fc γ RII/III.

3.8.1. Caracterización de monocitos aislados de médula ósea

Los monocitos aislados de médula ósea se analizaron en base al doble marcaje con mAb anti-Ly6C-FITC y anti-CD11b-PE, después de cada proceso de aislamiento.

3.8.2. Caracterización de las DCs y de los macrófagos diferenciados *in vitro* derivados de monocitos

Las DCs derivadas de monocitos fueron definidas a través del doble marcaje con anti-MCH-II-FITC y anti-CD11c-APC. Los macrófagos derivados de monocitos fueron definidos a través del doble marcaje con anti-F4/80-APC y anti-Ly6C-FITC. La caracterización de ambas poblaciones se llevó a cabo utilizando anticuerpos biotinilados anti-CD11b, CD86, que fueron revelados con estreptoavidina-PerCP.

3.8.3. Marcaje intracelular

Para la detección de iNOS se llevó a cabo un marcaje intracelular. En primer lugar, se realizó la tinción en superficie de las moléculas expresadas en la membrana, de la forma descrita anteriormente, pero con los anticuerpos al doble de concentración. A continuación se fijaron las células con paraformaldehído (Panreac) al 4% en PBS, en un volumen de 50 μ l durante 10 minutos a 4°C. Después de lavar las células, se realizó el marcaje intracelular compuesto de tres capas: anti-iNOS (Cell Signaling Technology, Danvers, MA), seguido de goat anti-rabbit biotinilado (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) y estreptoavidina-PerCP. Los 3 anticuerpos se diluyeron en PBS suplementado con 2% saponina (Sigma) para permeabilizar las células, y 0,5% BSA (Sigma) para bloquear las uniones inespecíficas; las incubaciones se llevaron a cabo durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

3.8.4. Análisis de las subpoblaciones celulares en el ganglio linfático de ratones infectados con *Leishmania major*

El análisis fenotípico de los monocitos y las DCs de los ganglios linfáticos de ratones infectados con *Leishmania major* fue realizado en suspensiones celulares tratadas con colagenasa y enriquecidas en DCs por depleción inmunomagnética, mediante citometría de flujo, después de la tinción con anti-Ly6C-FITC, anti-CD11b-PE y anti-CD11c-APC o anti-Ly6C-FITC, anti-MHC-II-PE y anti-CD11c-APC y los mAbs conjugados con biotina anti-CD86, B220, CD4, CD8 α , CD11b, F4/80, MHC-II, CCR7, CD103, CD115, Sirp- α o CD207, seguidos de estreptoavidina-PerCP.

3.8.5. Análisis de las subpoblaciones celulares en la dermis de ratones infectados con *Leishmania major*

El análisis fenotípico de los monocitos y las DCs de la dermis de ratones infectados con *Leishmania major* fue realizado en suspensiones celulares tratadas con colagenasa, mediante citometría de flujo, después de la tinción con anti-MHC-II-FITC, anti-Ly6G-PE y anti-CD11c-APC o anti-Ly6C-FITC, anti-MHC-II-PE junto con anti-Ly6G-PE y anti-CD11c-APC y los mAbs conjugados con biotina anti-CD86, B220, CD4, CD8 α , F4/80, CCR7, CD103, CD115, Sirp- α o CD207, seguidos de estreptoavidina-PerCP.

3.8.6. Análisis de las subpoblaciones celulares infectadas por *Leishmania major*

La caracterización de las células infectadas por los parásitos rojos fluorescentes DsRed⁺ de *Leishmania major*, fue realizada en suspensiones celulares tratadas con colagenasa de la dermis infectada y en suspensiones celulares tratadas con colagenasa y enriquecidas en DCs de los ganglios linfáticos, mediante citometría de flujo, después de la tinción con anti-Ly6C-FITC y anti-CD11c-APC y los mAbs conjugados con biotina anti-Ly6G, CD11b o MHC-II, seguidos de estreptoavidina-PerCP.

3.8.7. Análisis de las células derivadas de los monocitos marcados con CFSE transferidos en ratones infectados con *Leishmania major*

El análisis fenotípico de las células derivadas de monocitos, transferidos en ratones infectados con *Leishmania major*, fue realizada mediante citometría de flujo, en suspensiones celulares tratadas con colagenasa de la dermis infectada y en suspensiones celulares tratadas con colagenasa y enriquecidas en DCs de los ganglios linfáticos, después de la tinción con anti-MHC-II-PE junto con anti-Ly6G-PE y anti-CD11c-APC y los mAbs conjugados con biotina anti-Ly6C para la dermis y anti-CD11b-PE y anti-CD11c-APC o anti-MHC-II-PE y anti-CD11c-APC y los mAbs conjugados con biotina anti-Ly6C para los ganglios linfáticos.

El análisis de las tinciones de citometría de flujo fue realizado en un FACSCalibur (BD Biosciences), usando el software CELL Quest (BD Biosciences).

RESULTADOS

ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE LAS POBLACIONES DE MONOCITOS Y DCs EN LOS PO-LNs Y EN LA DERMIS DE RATONES C57BL/6 DURANTE LA INFECCIÓN POR *LEISHMANIA MAJOR*

Caracterización de las subpoblaciones celulares presentes en los ganglios poplíteos durante la infección con *Leishmania major* en ratones C57BL/6

Con el propósito de abordar los objetivos anteriormente mencionados, decidimos utilizar el modelo murino de infección con el parásito *Leishmania major*, causante como otras especies de su mismo género, de leishmaniasis cutánea. *Leishmania major* es un parásito protozoario cuyo vector de transmisión son los mosquitos de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* (Sacks and Noben-Trauth, 2002). Dado que *Leishmania major* es un patógeno intracelular obligado, una vez inoculado, infecta rápidamente las células presentes en la dermis. La respuesta inmunológica que se desencadena contra el patógeno, implica un proceso inflamatorio tanto en el sitio de infección como en los ganglios linfáticos drenantes.

Aunque la infección natural con *Leishmania major* tiene lugar a través de la picadura de estos mosquitos, en la mayoría de estudios se ha caracterizado la respuesta inmune frente a este parásito inoculando por vía subcutánea altas dosis del mismo en fase estacionaria en la almohadilla plantar del ratón. Por ello, para este trabajo se ha utilizado este mismo modelo de infección utilizado con anterioridad en nuestro laboratorio, el cual se describe en detalle en el apartado de Materiales y Métodos.

En primer lugar, se determinó en el ganglio poplíteo (PO-LN), el número de monocitos y de las distintas poblaciones de DCs en ratones sin infectar y tres semanas después de la infección con el parásito. En situación de reposo se observó que la población mayoritaria se correspondía con las dDCs (DCs dermales) que probablemente provienen de la dermis y migran a los ganglios linfáticos (Figura 1A). Esto concuerda con lo propuesto en situación de reposo en los ganglios linfáticos que drenan la piel, donde se ha descrito que las DCs derivadas de la piel son 7 veces más numerosas que DCs residentes (Henri et al., 2010). Sin embargo, durante la infección con *L. major*, se observó que se producía un fuerte reclutamiento de monocitos al PO-LN, así como, un incremento en el número de moDCs, generadas como consecuencia del proceso inflamatorio. También se observó un importante aumento de las dDCs y de las DCs residentes, es decir, cDCs y pDCs, como consecuencia de la infección (Figura 1B). En conjunto, estos datos muestran que durante infección por *L. major*, se produce un fuerte incremento en el número absoluto de las DCs presentes en los PO-LNs.

A continuación, se analizó el fenotipo las subpoblaciones de monocitos y DCs presentes en los PO-LNs que drenan el sitio de infección, en este caso los PO-LNs, de ratones C57BL/6 infectados 3 semanas antes con el parásito *L. major*. Esta caracterización se llevo a cabo

3 semanas tras la infección, puesto que a este tiempo la respuesta inicial Th2 que se da en los ratones C57BL/6, ya se encuentra redirigida hacia una respuesta protectora del tipo Th1 (Belkaid et al., 2000). Previamente al análisis por citometría de flujo, se deplecionaron las células B y T, las células NK y los granulocitos, mediante separación magnética, en base a la expresión de las moléculas CD19, CD3, CD49b y Ly6G respectivamente. En los ganglios de los ratones infectados con *L. major* se identificaron 5 poblaciones, de acuerdo con lo descrito por (Leon et al., 2007), en función del nivel de expresión de las moléculas CD11b, Ly6C, CD11c y MHC-II: (Figura 2A)

- monocitos (CD11b^{hi}, Ly6C^{hi}, CD11c⁻, MHC-II⁻)
- moDCs (CD11b^{hi}, Ly6C^{hi}, CD11c^{int}, MHC-II^{hi})
- DCs plasmacitoides (pDCs) (CD11b^{lo}, Ly6C^{hi}, CD11c^{int}, MHC-II^{lo})
- DCs dermales (dDCs) (CD11b^{hi}, Ly6C^{lo}, CD11c^{int}, MHC-II^{hi})
- DCs convencionales (cDCs) (CD11b^{hi}, Ly6C^{lo}, CD11c^{hi}, MHC-II^{int})

Asimismo, se realizó un amplio estudio fenotípico de estas subpoblaciones de una serie de moléculas de superficie, que han servido para definir las distintas poblaciones de DCs descritas en los órganos linfoides del ratón (Figura 2B). En lo que se refiere a los monocitos, se observó que presentaban un nivel intermedio de la molécula MHC-II, posiblemente como resultado de su estado activado. A su vez, expresaban las moléculas CD24 y Sirp- α , y un nivel más bajo de F4/80. Las moDCs, presentaron un fenotipo muy similar al de los monocitos, salvo por la alta expresión de MHC-II y CD11c.

Tal y como se ha descrito previamente en la Introducción, en la piel existen tres subtipos principales de DCs. Las células de Langerhans (LCs) que residen en la epidermis y se caracterizan por el siguiente fenotipo; MHC-II^{hi}, CD207^{hi}, CD11c⁺, CD11b^{int}, CD205⁺ y EpCAM⁺ y por la presencia de gránulos de Birbeck en el citoplasma. En la dermis, encontramos dos subpoblaciones de DCs, una a la que se denomina DCs CD103⁺, y que además expresan CD11b^{lo}, CD207⁺ CD11c^{hi}, MHC-II⁺, EpCAM⁻, F4/80⁻ y Sirp- α ⁻. La otra subpoblación son las llamadas DCs CD11b⁺, y que además expresan CD103⁻, CD207⁻ CD11c^{hi}, MHC-II⁺, EpCAM⁻, F4/80⁺ y Sirp- α ⁺. Las dDCs del PO-LN mostraron un fenotipo caracterizado por una alta expresión de CD11c, muy alta de MHC-II y la ausencia de expresión de la molécula Ly6C. Alrededor de un 85% de la población expresaba niveles altos de CD11b y Sirp- α . Las moléculas CD9 y CD24 se expresaban a niveles intermedios. También pudimos observar que un 4% de las dDCs que eran CD103⁺. De la misma manera observamos un 3% de células EpCAM⁺ que corresponderían a las LCs que han migrado desde la dermis. Principalmente esta población parece estar constituida por las DCs dermales CD11b⁺.

Entre las cDCs, distinguimos la subpoblación CD8⁺, que resultaba ser minoritaria con un 8% del total y caracterizada también por ser CD103⁺, CD24⁺, Sirp- α ⁻ y la subpoblación CD8⁻ que

representaba el 92% del total, identificada por ser además CD103⁺, CD24⁻ y Sirp- α ⁺. Además, las cDCs presentaron niveles intermedios de expresión de la molécula CD9. En cuanto a las pDCs, pudimos observar la regulación positiva de la molécula CD8, reflejo de su estado de activación debido a la infección. Esta subpoblación también expresaba CD24 y una pequeña parte también expresaba la molécula CD4. No se observó la expresión del marcador CD115 para ninguna de las poblaciones presentes en el PO-LN. Esto puede deberse a que el tratamiento con colagenasa degrada esta molécula, tal y como se ha descrito que ocurre en otros tejidos (Drevets et al., 2010).

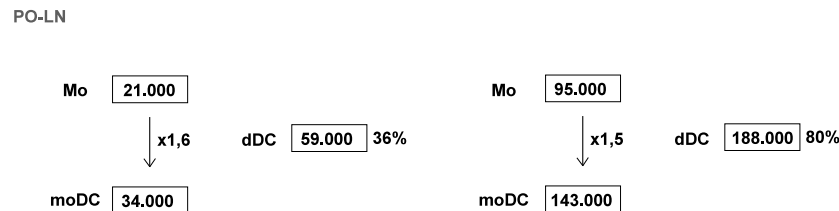
Cinética de las subpoblaciones celulares presentes en los ganglios poplíteos durante la infección con *Leishmania major* en ratones C57BL/6

Con el fin de profundizar en la regulación de la diferenciación de las distintas subpoblaciones de monocitos y DCs durante la infección por *Leishmania major*, se analizaron las variaciones en el número absoluto de las distintas subpoblaciones de monocitos y DCs presentes en los PO-LNs de ratones C57BL/6 (Figura 3). En una primera fase se analizaron dichas subpoblaciones 2, 3 y 4 semanas después de la infección con el parásito.

En primer lugar se identificaron las distintas subpoblaciones de monocitos y DCs en base a los perfiles de citometría tras el marcaje de las moléculas descritas en el apartado anterior (Figura 3A). En cuanto al número total de células de los ganglios infectados, éste se mantuvo constante a lo largo de las 3 semanas (Figura 3B). En el caso de los monocitos su número absoluto se mantuvo prácticamente sin cambios entre la 2^a y la 4^a semana. Lo mismo ocurrió con el número absoluto de cDCs y pDCs que permaneció prácticamente constante a lo largo de este periodo. Por el contrario, el número absoluto de moDCs disminuyó progresivamente entre la semana 2 y la semana 4 al igual que en el caso de las DCs migratorias, las dDCs, que lo hicieron de manera más notable. Estos datos ponen de manifiesto en concordancia con estudios previos (Sacks and Noben-Trauth, 2002), que el establecimiento de la respuesta protectora de tipo Th1 se da entre la 2^a y la 3^a semana, y es a partir de la 4^a semana cuando empieza la resolución de la infección y la inflamación. Por otra parte, estos resultados parecen indicar que a lo largo de la infección se produce un continuo reclutamiento de monocitos y de pre-DCs a los ganglios linfáticos, y un constante proceso de generación de los distintos subtipos de DCs, como consecuencia del entorno inflamatorio.

Sin embargo el análisis a tiempos mas cortos, reveló que entre el día 9 y el día 12 tras la infección se produce un incremento drástico en el número total de células del ganglio al igual que en el número absoluto de cada una de las subpoblaciones, siendo más acusado en el caso de los monocitos, moDCs y dDCs (Figura 3C). Estos datos reflejan que el inicio del establecimiento de una respuesta inmunológica de tipo Th1 frente al parásito, conlleva un

fuerte reclutamiento de monocitos a los PO-LNs. Tal y como se muestra en el Diagrama 1 en el que se describe una estimación de las variaciones en el número absoluto de monocitos a día 9 y 12 post-infección en el PO-LN, correspondiente al experimento mostrado en la Figura 3C, se produce un acumulo de unos 183.000 monocitos en el PO-LN durante esas 72 horas. Esto querría decir, que la tasa de reclutamiento sería de, aproximadamente, 2500 monocitos/hora durante el inicio de la respuesta inflamatoria.



Caracterización de las subpoblaciones celulares presentes en la dermis durante la infección con *Leishmania major* en ratones C57BL/6

Posteriormente se caracterizaron las poblaciones celulares que infiltraban la dermis de ratones C57BL/6 infectados con *L. major* en la almohadilla plantar. Esta caracterización se llevó a cabo a las 3 semanas de la infección, puesto que la respuesta protectora del tipo Th1 ya se encuentra establecida a este tiempo.

En el sitio de infección se identificaron cuatro poblaciones en función del nivel de expresión de las moléculas CD11b, Ly6C, CD11c, MHC-II y Ly6G: (Figura 4A)

- monocitos (CD11b^{hi}, Ly6C^{hi}, CD11c⁻, MHC-II⁻, Ly6G⁻)
- dDCs (CD11b^{hi}, Ly6C^{lo}, CD11c^{int}, MHC-II^{hi}, Ly6G⁻)
- neutrófilos (CD11b^{hi}, Ly6C^{lo}, CD11c⁻, MHC-II⁻, Ly6G^{hi})
- eosinófilos (CD11b^{hi}, Ly6C^{lo}, CD11c⁻, MHC-II⁻, Ly6G⁻)

A continuación, se calculó el número de células correspondiente a cada una de las subpoblaciones presentes en la almohadilla plantar 3 semanas después de la infección con el parásito. Se observó que la población mayoritaria fueron las dDCs. La inflamación también indujo el reclutamiento de monocitos a la lesión, dado el bajo número de leucocitos que infiltran la dermis en situación de reposo. Además, otras poblaciones reclutadas a la zona de infección a consecuencia de la infección, fueron neutrófilos y eosinófilos (Figura 4B). En conjunto, estos datos muestran que durante infección por *L. major*, se induce el reclutamiento de monocitos tanto a la dermis como a los PO-LNs y un fuerte incremento en el número absoluto de DCs en ambas localizaciones.

Se realizó también un análisis fenotípico de las subpoblaciones presentes en el sitio de infección en base a la expresión de distintas moléculas de superficie que han servido para definir las distintas poblaciones de DCs descritas en los tejidos no linfoides del ratón (Figura 4C). Con respecto a los monocitos, haciendo un análisis comparativo del fenotipo entre aquellos reclutados a los PO-LNs y los reclutados a la dermis, podríamos decir que el patrón de expresión de las distintas moléculas es muy similar en ambas localizaciones, a excepción de la molécula de MHC-II, que solo se expresa en los monocitos presentes en los ganglios, lo cual sugiere un mayor estado de activación. Por su parte, las dDCs presentes en la dermis y las moDCs presentes en los PO-LNs, si difieren en su fenotipo. Las dDCs presentan un nivel más bajo de expresión de la molécula CD11c con respecto a las moDCs del ganglio, y apenas expresan Ly6C. Sin embargo, expresan otras moléculas, como son CD4 y CD9. En lo que se refiere a las dDCs presentes en el ganglio en comparación con las dDCs de la zona de infección, presentan un fenotipo muy similar. Las dDCs del ganglio muestran un nivel más alto de expresión de MCH-II y CD11c, debido al proceso de maduración que se da como resultado de la migración a través del sistema linfático hasta el ganglio. Este hecho está apoyado también, por la expresión del receptor CCR7 implicado en dicho proceso migratorio (Ohl et al., 2004). No se observó marcaje para la molécula Ep-CAM, que identifica a las células de Langerhans residentes en la epidermis. Asimismo, al igual que ocurría en el PO-LN, tampoco se observó la expresión del marcador CD115 para ninguna de las poblaciones que infiltraban la lesión.

	Mono (Dermis)	Mono (PO-LN)	moDCs (PO-LN)	dDC (Dermis)	dDC (PO-LN)
CD11c	-	-	+++	++	+++
Ly6C	++	+++	++	-	-
MHC-II	-	+	++	++	++++
CD4	-	-	-	+	-
F4/80	+	+	+	+	-
CD9	-	-	+	++	++

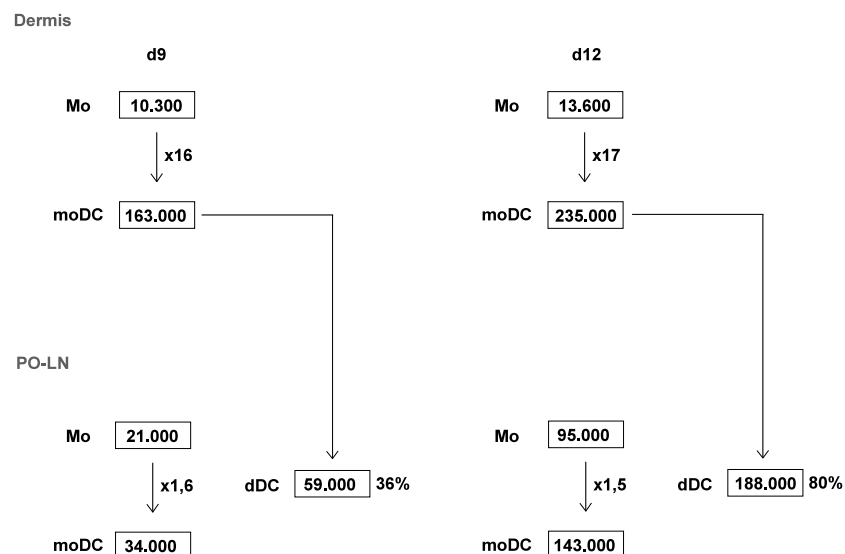
En lo que se refiere a los eosinófilos, presentaron un alto nivel de los marcadores CD11b y Siglec-F. También expresaron niveles intermedios de F4/80 y CD9 y niveles bajos de CD11c, MHC-II y Ly6C. Dado que su fenotipo resulta muy similar al descrito para los macrófagos presentes en la dermis, y que además los macrófagos alveolares se caracterizan por expresar el marcador Siglec-F, su identidad se comprobó mediante la separación por citometría de flujo y posterior análisis morfológico de las células fijadas mediante citocentrifugación tras su tinción con el reactivo de Giemsa. Este estudio reveló que estas células presentaban una morfología propia de los eosinófilos con un núcleo bilobulado y sus característicos gránulos citoplásmicos acidófilos (Figura 4D).

Cinética de las subpoblaciones celulares presentes en la dermis durante la infección con *Leishmania major* en ratones C57BL/6

De la misma manera, con el fin de estudiar los cambios que se producen en el número absoluto de las distintas subpoblaciones de monocitos y de DCs que infiltran la dermis de ratones C57BL/6, se analizaron dichas variaciones entre la 2ª y la 4ª semana tras la infección con el parásito (Figura 5).

El número de monocitos que infiltraban la dermis, fue disminuyendo progresivamente hasta la 4ª semana. En cuanto al número de moDCs, también decreció de forma notable entre la 2ª y la 4ª semana tras infección. Este mismo comportamiento se observó en el caso de los eosinófilos, cuyo número fue descendiendo hasta hacerse prácticamente indetectable durante la última semana. Por último, en cuanto a los neutrófilos, su número también disminuyó paulatinamente hasta la 4ª semana (Figura 5B). Estos datos muestran como la reacción inflamatoria en la dermis de ratones C57BL/6 infectados con *L. major*, tiene lugar durante la 2ª semana y es a partir de la 3ª y la 4ª cuando comienza la recuperación de la lesión.

En la cinética a tiempos cortos, el análisis de la subpoblaciones entre los días 9 y 12 tras la infección con el parásito, reveló que el número de todas las poblaciones que infiltran la dermis, aumentó a consecuencia del proceso infeccioso. En cuanto a las dDCs resultó ser la población mayoritaria a ambos tiempos (Figura 5C). Al igual que ocurría en el ganglio, estos datos muestran que durante el inicio de la respuesta inmunológica contra el parásito, se produce un gran reclutamiento de monocitos en la dermis. De nuevo, en el Diagrama 2 se describe una estimación de las variaciones en el número absoluto de monocitos en la dermis a día 9 y 12 post-infección, correspondiente al experimento mostrado en la Figura 5C. A lo largo de las 72h de estudio, se produce una acumulación de 204.000 monocitos, lo cual implica una tasa de reclutamiento de 2.800 monocitos/hora en la dermis.



Además, se observó una gran diferencia en la proporción relativa dDC/monocito de la dermis en comparación con la proporción relativa moDC/monocito en el PO-LN, a los distintos tiempos de estudio tal y como se muestra en la Tabla 1, si asumimos que las dDCs generadas en la dermis provienen de los monocitos reclutados a la misma, como consecuencia del proceso inflamatorio, y que a su vez las moDCs generadas en los PO-LNs también derivan de los monocitos reclutados a esta localización, de acuerdo con los datos previos de (Leon et al., 2007).

Tabla 1

		9d	12d	2w	3w	4w
Dermis	$\frac{\text{dDC}}{\text{Mo}}$	15,7	17,2	40,4	41,4	14,9
PO-LN	$\frac{\text{moDC}}{\text{Mo}}$	1,6	1,5	2,7	1,7	1,3

Estas diferencias observadas en la proporción relativa entre DC/monocito en la dermis con respecto al PO-LN, nos hizo pensar que podía deberse a un tiempo de transición diferente en cada una de las localizaciones, es decir, que probablemente los mediadores inflamatorios presentes en cada una de las zonas determine el tiempo de transición de monocito a dDC en el caso de la dermis y de monocito a moDC en el PO-LN. Para hacer una estimación del tiempo de transición, se realizó una aproximación en base al número de monocitos que se acumulan a lo largo de las 72 horas de estudio, es decir, entre el día 9 y 12 tras la infección con el parásito. En la dermis pudimos observar que se producía un acúmulo de 3.300 monocitos durante este periodo y que por tanto si la tasa de reclutamiento, como hemos indicado anteriormente, era de 2.800 monocitos/hora, esto querría decir que la diferenciación de monocito a dDC tendría una duración media de 1,2 horas. De la misma manera, haciendo una aproximación equivalente en el PO-LN, comprobamos que el tiempo de diferenciación de monocito a moDC estaría entorno a las 30 horas. Estos datos, aun dejando a un lado otros factores implicados en este proceso, tales como la vida media y la apoptosis de las distintas poblaciones o la tasa de migración desde la dermis al PO-LN, sugieren que el proceso de diferenciación de los monocitos a DCs en distintas localizaciones, está condicionado por el entorno inflamatorio y las distintas citoquinas y quimioquinas presentes en el microambiente.

Análisis de la diferenciación *in vivo* en dDCs y moDCs de los monocitos transferidos por vía intravenosa en ratones C57BL/6 infectados con *Leishmania major*

Con el propósito de abordar la hipótesis anteriormente expuesta, se realizaron ensayos de transferencia de monocitos *in vivo*. Para estos experimentos, se aislaron monocitos de la médula ósea de ratones C57BL/6 (con una pureza superior al 95%) y se marcaron con CFSE para detectar los monocitos transferidos y las células derivadas de los mismos. Los monocitos

se transfirieron por vía intravenosa en ratones C57BL/6 que habían sido infectados con *L. major* 12 días antes. Posteriormente, se analizaron las células CFSE⁺, tanto en los ganglios como en la dermis, a distintos tiempos (12, 24 y 72 horas) tras la transferencia de monocitos.

En la dermis de los ratones infectados 2 semanas antes con el parásito, 12, 24 o 72 horas después de la transferencia, pudimos observar que los monocitos transferidos CFSE⁺ eran prácticamente indetectables, mientras que las únicas células que presentaban marcaje eran las dDCs derivadas de dichos monocitos transferidos (Figura 6A). Por tanto, los monocitos transferidos son reclutados desde la sangre a la dermis a través de las vénulas dermales y se diferencian muy rápidamente a dDCs *in vivo*, ya que a las 12 horas tras la transferencia, casi la totalidad de los monocitos transferidos se habían diferenciado a dDCs.

		Monocitos transferidos	dDCs derivadas monocitos transf.	Porcentaje relativo de diferenciación
12h	nº	150	6700	98%
24h	nº	800	8000	91%
72h	nº	0	2700	100%

En los ganglios poplíteos, observamos que 12 horas tras la transferencia, la mayoría de células CFSE⁺ resultaban ser los monocitos que habían sido reclutados hasta los ganglios y tan sólo un 5% de éstos se habían diferenciado a moDCs CFSE⁺. A las 24 horas tras la transferencia, seguíamos viendo que las células CFSE⁺ se correspondían principalmente con los monocitos, sin embargo el porcentaje de moDCs CFSE⁺ había aumentado, representando un 23% del total de los monocitos transferidos. El resto de las poblaciones de DCs presentes en los ganglios no mostraron marcaje para CFSE a ninguno de estos dos tiempos de estudio. Por último, se analizó la diferenciación de los monocitos a las 72 horas de ser transferidos y al contrario de lo que ocurría a tiempos más cortos, se observó que solo una minoría de los monocitos totales presentaba marcaje para CFSE, mientras que el 92% de los monocitos transferidos se habían diferenciado localmente a moDCs CFSE⁺. Además se observó que un 0,7% de las dDCs totales eran CFSE⁺, y éstas podrían corresponderse con los monocitos reclutados a la dermis, que se habrían diferenciado a dDCs y posteriormente habrían migrado desde la periferia a los PO-LNs (Figura 6B). Mientras que en el caso de la dermis, 12 horas después de la transferencia se han diferenciado casi la totalidad de los monocitos reclutados, en el caso del PO-LN, esto no se observa hasta pasadas 72 horas tras la transferencia. Estos datos sugieren que la diferenciación *in vivo* de los monocitos reclutados al ganglio, a través de las vénulas del endotelio alto, da lugar a la generación de moDCs y que este tiempo de transición es más largo en el ganglio que en la dermis, por tanto la dermis presenta una mayor tasa de diferenciación de monocitos *in vivo* durante infección por *L. major*.

		Monocitos transferidos	moDC derivadas monocitos transf.	Porcentaje relativo de diferenciación	dDCs derivadas monocitos transf.
12h	%	12.2	1.9	-	0
	n°	7100	400	5%	-
24h	%	7.9	3.1	-	0
	n°	5100	1500	23%	-
72h	%	1	6	-	0.7
	n°	900	11000	92%	1200

Por otra parte, también se observó que un 1,7% de las cDCs y un 0,3% de las pDCs, presentaban tinción para CFSE. Este hecho podría reflejar una contaminación de los monocitos aislados de la médula ósea por otros precursores. La estimación en base al marcaje de distintas moléculas de superficie que identifican a diferentes precursores, como CD11c, Flt3, c-kit, CD34 y Sca-1, reveló que las preparaciones de monocitos podrían contener un 0,1% de pre-DCs, que dada su alta tasa proliferativa podrían contribuir a la generación de cDCs.

ORIGEN Y DIFERENCIACIÓN DE LAS DCs INFLAMATORIAS PRESENTES EN EL PO-LN Y EN LA DERMIS DURANTE LA INFECCIÓN POR *LEISHMANIA MAJOR*

Caracterización de las subpoblaciones celulares presentes en los ganglios poplíteos durante la infección con *Leishmania major* en ratones CCR2 KO

Como hemos observado, durante la infección con *L. major* en ratones C57BL/6, se produce un importante incremento en el número de monocitos reclutados, tanto a la dermis como a los PO-LNs drenantes. Basándonos en el estudio fenotípico de las distintas DCs presentes, el análisis de las cinéticas y en los ensayos de transferencia de monocitos, nos planteamos si las dDCs presentes en la dermis y los PO-LNs y las moDCs presentes en los PO-LNs podían derivar de monocitos reclutados a esas zonas y diferenciados *in vivo*. Para intentar abordar esta hipótesis utilizamos los ratones deficientes para el receptor CCR2, que ha sido previamente descrito como una molécula esencial implicada en el mecanismo de extravasación de los monocitos desde la médula ósea al torrente sanguíneo y su reclutamiento a los focos inflamatorios (Tsou et al., 2007), y que además se expresa en los monocitos Ly6C^{hi}, que son aquellos que principalmente se movilizan durante procesos inflamatorios.

El análisis de los números de las poblaciones de monocitos y de DCs presentes en los ganglios de los ratones CCR2 KO en ausencia de infección, mostró que todas las poblaciones estaban fuertemente disminuidas con respecto a los ratones C57BL/6, resultando ser de entre el 80-85% en el caso de las moDCs y pDCs y mayor del 90% para el resto de poblaciones. Por este

motivo, las poblaciones predominantes en los ratones CCR2 KO son las DCs residentes, cDCs y pDCs (Figura 7A y 7B).

A continuación, se caracterizaron las poblaciones presentes en los PO-LNs que drenan la dermis, a las tres semanas de la infección con *L. major*. Para ello, se utilizaron los mismos marcadores de superficie descrito anteriormente, CD11b, Ly6C, CD11c y MHC-II, para su identificación por citometría de flujo. En los ganglios poplíteos de los ratones CCR2 KO se caracterizaron las mismas 5 poblaciones previamente descritas para los C57BL/6; monocitos, moDCs, pDCs, dDCs y cDCs (Figura 8A). Se calculó el número absoluto de las poblaciones de monocitos y DCs presentes en los ganglios de los ratones CCR2 KO, tres semanas después de la infección con el parásito *L. major* en comparación con los ratones C57BL/6. Este cálculo reveló una importante reducción en el número de monocitos y también un drástico descenso del número de moDCs, que fue de entorno al 92%. También se observó un descenso considerable en el número absoluto de dDCs y cDCs, del 36% y el 61%, respectivamente, pero no así en el número de pDCs (Figura 8B).

Seguidamente, se realizó un análisis fenotípico de estas subpoblaciones, en base a la expresión de distintas moléculas de superficie. No se observaron diferencias relevantes en comparación con el fenotipaje realizado en los ratones C57BL/6 (Figura 8C). Los monocitos, las moDCs y las pDCs presentaron un patrón de expresión de las distintas moléculas similar en ambas cepas. En el caso de las dDCs, se observó que en los ratones CCR2 KO, el nivel de la molécula CCR7 era algo más bajo. En cuanto a las cDCs se observó una mayor proporción de la subpoblación CD8⁺, siendo esta del 15%, que se correlacionaba con la expresión de otros marcadores como CD103 y CD24, característicos de esta subpoblación.

Cinética de las subpoblaciones celulares presentes en los ganglios poplíteos durante la infección con *Leishmania major* en ratones CCR2 KO

Se analizó la misma cinética que la descrita anteriormente para los ratones C57BL/6, es decir, 2, 3 y 4 semanas tras la infección con *L. major* con el fin de estudiar los cambios cuantitativos que se producen en las distintas poblaciones de monocitos y DCs en los ganglios poplíteos que drenan la dermis de ratones CCR2 KO.

En este estudio, pudimos observar que el número total de células presentes en el ganglio 2 semanas tras la infección, fue similar al de los PO-LNs de los ratones C57BL/6. Sin embargo este número se incrementó de manera importante a partir de la 3ª semana, indicando la progresión de la reacción inflamatoria en los ratones CCR2 KO. A lo largo del periodo de estudio, se observó una drástica reducción en el número absoluto de monocitos reclutados, que fue de una media del 88%, así como de las moDCs presentes, cuya disminución fue de

alrededor del 91%, a 2, 3 y 4 semanas en comparación con los ratones C57BL/6, que permaneció prácticamente constante durante ese tiempo. Las dDCs presentaron una reducción de alrededor del 48% en su número absoluto con respecto a los ratones C57BL/6 y siguieron la misma tendencia que éstos al ir decreciendo gradualmente durante este periodo. En el caso de las cDCs, su número absoluto también resultó estar bastante disminuido entorno al 56%, aunque éste apenas varió a lo largo de las distintas semanas. Finalmente, en lo que respecta a las pDCs su número absoluto no presentó diferencias significativas con respecto a los ratones C57BL/6 (Figura 9A y 9B). En conclusión estos datos reflejan el defecto que presentan los ratones CCR2 KO en el reclutamiento de monocitos a los PO-LNs, lo que se traduce en una fuerte reducción en el número absoluto de moDCs a lo largo del tiempo de estudio. Estos resultados apoyan nuestra hipótesis de partida debido a la gran correlación observada en la reducción del número absoluto de monocitos y moDCs, lo cual refuerza la idea de que durante la infección por *L. major* los monocitos se diferencian *in vivo* a moDCs en el PO-LN. Y así mismo, estos datos confirman datos previos descritos por (Leon et al., 2007), basados en la transferencia de monocitos, en los que ya se proponía que las moDCs provienen de monocitos reclutados al PO-LN durante la infección por *Leishmania major*.

Caracterización de las subpoblaciones celulares presentes en la dermis durante la infección con *Leishmania major* en ratones CCR2 KO

A continuación, se caracterizaron las poblaciones de monocitos y células dendríticas que infiltran la dermis de los ratones CCR2 KO, tres semanas después de la infección con *L. major* en la almohadilla plantar, al igual que previamente se realizó con los ratones C57BL/6.

Tal y como se ha descrito anteriormente, la caracterización se hizo en base a los marcadores de superficie CD11b, Ly6C, CD11c, MHC-II y Ly6G. De esta forma pudieron identificarse las mismas subpoblaciones: monocitos, dDCs, neutrófilos y eosinófilos, que encontramos en los ratones C57BL/6, y cuyos niveles de expresión de dichas moléculas eran similares (Figura 10A). También se calculó el número absoluto de cada una de las subpoblaciones presentes en el en la dermis tres semanas tras la infección con el parásito, al igual que en el caso de los ratones C57BL/6. Los monocitos y, en mayor medida, las dDCs, presentes en la almohadilla plantar, estaban drásticamente disminuidos en los ratones CCR2 KO, siendo estas reducciones de un 65% y un 90%, respectivamente. Sin embargo, la población más representada fueron los neutrófilos cuyo número fue 4 veces superior al de los ratones C57BL/6 y el número absoluto de eosinófilos presentes, resultó estar aumentado al doble (Figura 10B).

De la misma manera, se realizó un fenotipaje más completo de las cuatro poblaciones, en el que tampoco se observaron diferencias significativas con respecto a los patrones de expresión que presentaban estas mismas poblaciones en los ratones C57BL/6 (Figura 10C). En el caso

de los monocitos, se observó que presentaban menor nivel de expresión de la molécula CD9. Las dDCs también presentaron niveles más bajos de expresión de las moléculas CD4, CD9, F4/80 e iNOS, en comparación con lo observado en los ratones C57BL/6.

Cinética de las subpoblaciones celulares presentes en la dermis durante la infección con *Leishmania major* en ratones CCR2 KO

Posteriormente se analizaron las variaciones en el número absoluto de cada una de las subpoblaciones que infiltran la dermis en los ratones CCR2 KO, durante la infección con *Leishmania major*, realizando el mismo estudio anteriormente descrito para los ratones C57BL/6, es decir, 2, 3 y 4 semanas tras la infección.

Pudimos observar que los monocitos reclutados a la dermis resultaban estar considerablemente reducidos en relación con lo observado en los ratones C57BL/6, con una reducción media del 75%. Asimismo, el número absoluto de dDCs descendió drásticamente a los tres tiempos de estudio, sufriendo una disminución de alrededor del 95% en comparación con los ratones C57BL/6. Con respecto a los eosinófilos presentes, su comportamiento fue similar al observado en el caso de los ratones C57BL/6, ya que su número fue disminuyendo paulatinamente entre la 2ª y la 4ª semana tras la infección. Sin embargo, el número absoluto de neutrófilos se incrementó de forma significativa entre la semana 2 y la semana 3 y siguió aumentando a partir de la 4ª, siendo la población mayoritaria y llegando a estar 12 veces más aumentada que en el caso de los ratones C57BL/6 (Figura 11A y 11B). Estos datos apuntan a que ante la imposibilidad de generar dDCs *in vivo* en el sitio de infección, se produce un continuo reclutamiento de neutrófilos para la eliminación del patógeno, que en último término no puede contener la diseminación del parásito, haciendo que estos ratones CCR2 KO, a pesar de tener un fondo genético resistente a la infección por *L. major*, se vuelvan susceptibles.

En resumen, tanto los resultados obtenidos tras el análisis del PO-LN y de la dermis, mostraron que como consecuencia de la deficiencia que presentan los monocitos inflamatorios para extravasarse desde la médula ósea en los ratones CCR2 KO, se produce un dramático descenso en su reclutamiento tanto a la zona de infección como a los ganglios poplíteos drenantes, lo cual se traduce en una drástica reducción en el número de moDCs del PO-LN, así como en el número de dDCs de la dermis. Por tanto, estos datos claramente sugieren que la mayoría de moDCs presentes en el PO-LN y de dDCs presentes en la dermis, se originan a partir de los monocitos reclutados a ambas localizaciones que se diferencian localmente a DCs como consecuencia del proceso inflamatorio producido por la infección con *L. major*.

Los datos derivados del estudio en los ratones CCR2 KO también revelaron que la proporción relativa dDC/monocito de la dermis en comparación con la observada en los ratones C57BL/6,

es considerablemente más baja, tal y como se muestra en la Tabla 2. Por tanto, haciendo el mismo razonamiento que el descrito anteriormente en el caso de los ratones C57BL/6, estos datos podrían indicar que la tasa de diferenciación de monocito a dDC en la dermis es significativamente menor.

Tabla 2

			2w	3w	4w
Dermis	dDC Mo	C57BL/6	40	43	15
		CCR2KO	7	8	2
PO-LN	moDC Mo	C57BL/6	2.7	1.8	1.3
		CCR2KO	3	1.9	0.8

Por otra parte, los datos obtenidos muestran que a pesar de la gran reducción en el número de moDCs en el PO-LN y dDCs en la dermis, las dDCs presentes en el PO-LN, y que teóricamente provendrían de la migración a través de los vasos linfáticos desde la dermis hasta el PO-LN, sólo están parcialmente reducidas, siendo esta reducción de aproximadamente del 40%.

Análisis del grado de infección de las subpoblaciones presentes en los ganglios poplíteos y en la dermis de ratones C57BL/6 y ratones CCR2 KO

Con el propósito de abordar si la distinta proporción relativa dDC/monocito de la dermis de los ratones CCR2 KO es consecuencia de un mayor grado de parasitemia en el sitio de infección en los ratones CCR2 KO, analizamos el grado de infección de las distintas poblaciones presentes en los PO-LNs de ratones C57BL/6 y CCR2 KO. Para ello, se infectaron dichos ratones con una cepa de *L. major*, modificada genéticamente, que expresa de forma constitutiva la proteína fluorescente DsRed, que denominaremos *L. major* Red y se analizaron a las tres semanas tras la infección mediante citometría de flujo (Figura 12).

En el PO-LN de los ratones C57BL/6, el porcentaje total de células infectadas fue del 0,3%, mientras que en los CCR2 KO de un 2,3%, es decir, 7 veces superior. Las moDCs resultaron ser la población más infectada en ambos casos, con un 1,6% de células DsRed⁺ y un 26% en los ratones C57BL/6 y CCR2 KO, respectivamente. Las cDCs de los ratones C57BL/6, presentaban un nivel de infección del 1,1%, y en el caso de los monocitos y dDCs fue del 0,5% aproximadamente. En el caso de los ratones CCR2 KO, los monocitos, dDCs, cDCs, también presentaron un grado de internalización del parásito mayor, en torno al 4-5%. Por el contrario, el porcentaje de pDCs que resultaron infectadas fue prácticamente despreciable en ambas cepas (Figura 12A). En resumen, todas las poblaciones presentes en el PO-LN de los ratones CCR2 KO se vieron más altamente infectadas que las de los ratones C57BL/6.

Seguidamente, se estudió el grado de infección de las distintas poblaciones de monocitos y DCs que infiltran la dermis tres semanas después de la infección con *L. major* Red, en ratones C57BL/6 y CCR2 KO (Figura 12B).

Se observó que el porcentaje total de células infectadas era mucho mayor en el sitio de infección que en los ganglios poplíteos. En los ratones C57BL/6, el 14% de las células totales presentes en la lesión, estaban infectadas con *L. major* Red, frente al 35% observado en los ratones CCR2 KO. En ambos casos, fueron las poblaciones de dDCs y de neutrófilos las que presentaban mayor porcentaje de internalización del parásito, siendo de aproximadamente un 30% en los ratones C57BL/6 y un 55% en los ratones CCR2 KO. A su vez, los eosinófilos mostraron un alto grado de infección en los ratones CCR2 KO en comparación con los ratones C57BL/6, que ascendía al 21% y al 6%, respectivamente. De la misma manera, un 13% de los monocitos reclutados a la lesión resultaban infectados por *L. major* Red en los ratones CCR2 KO frente al 5% de los ratones C57BL/6. Esencialmente, los resultados obtenidos muestran que la parasitemia en los ratones CCR2 KO era significativamente mayor, tanto en la dermis como en los ganglios poplíteos, que en los ratones C57BL/6. En los ratones C57BL/6, estos datos podrían reflejar que tres semanas después de la inoculación de *L. major*, en la dermis se está resolviendo la infección, siendo las células más fagocíticas las que resultan más infectadas, conteniendo así la diseminación del patógeno a los ganglios linfáticos drenantes, que presentan un bajo nivel de infección. En el caso de los ratones CCR2 KO, estos resultados sugieren que la alta parasitemia observada anteriormente en la dermis, de lugar a la diseminación del parásito que sería transportado por las dDCs hasta el ganglio, donde parece replicarse preferentemente en las moDC, y lo cual se traduce en un mayor grado de infección en esta zona.

En conclusión, estos datos podrían apoyar la hipótesis anteriormente planteada en la que la diferenciación de monocito a dDC en la dermis de los ratones CCR2 KO está disminuida en comparación con los ratones C57BL/6, debido al mayor grado de infección observado en el conjunto de las células que infiltran la lesión, y concretamente en el mayor grado de infección observado en los monocitos y dDCs. Por otra parte, otra hipótesis que explicaría esa menor proporción relativa dDC/monocito de la dermis de los ratones CCR2 KO podría ser que, no sólo el proceso de extravasación de monocitos de la médula ósea sea dependiente de CCR2, si no también, el proceso de diferenciación de los mismos a DCs. A este respecto, experimentos *in vitro* realizados tras el aislamiento de monocitos de la médula ósea de ratones CCR2 KO y cultivados en presencia de GM-CSF durante 48 horas, mostraron que se produce una correcta diferenciación a DCs derivadas de monocitos, similar a la obtenida en paralelo a partir de monocitos de ratones C57BL/6 (dato no mostrado). A pesar de las limitaciones de esta aproximación *in vitro* utilizada, estos resultados apuntan a que el proceso de diferenciación de los monocitos a DCs es independiente de la molécula CCR2.

Análisis de la migración de las dDCs a los ganglios linfáticos, en ratones C57BL/6 y CCR2 KO infectados con *Leishmania major*

Con el fin de explicar la reducción parcial en el número de dDCs presentes en el PO-LN, en comparación con la drástica reducción del número absoluto de dDCs presentes en la dermis de ratones CCR2 KO durante infección con *L. major*, nos planteamos que no todas las dDCs presentes en el PO-LN migran desde la dermis, y por tanto, otro precursor reclutado directamente al PO-LN a través de la sangre podría contribuir a la generación de esta subpoblación. Sin embargo, otra posible explicación podría ser que a pesar de la fuerte reducción en el reclutamiento de monocitos y por ende, en la generación de dDCs en la dermis, las dDCs del PO-LN estuvieran disminuidas de manera parcial debido a la acumulación continuada de las mismas a lo largo de la infección. Para intentar abordar estas cuestiones, decidimos analizar el proceso de migración desde la dermis a los PO-LNs en los ratones C57BL/6 y CCR2 KO y la acumulación de dDCs en los PO-LNs a lo largo del tiempo. Para ello, se infectaron por vía intradérmica ratones C57BL/6 y CCR2 KO en la oreja, con *L. major* y tres semanas después se utilizó un modelo de sensibilización por contacto de las orejas mediante la aplicación de una solución irritante que contenía FITC como marcador para detectar las células migratorias (Hill et al., 1990).

En primer lugar, se identificaron mediante citometría de flujo las poblaciones de monocitos y DCs presentes en los ganglios auriculares que drenan la oreja, para comprobar que se correspondían con las poblaciones anteriormente descritas en los ganglios poplíteos (Figura 13A), y se calculó el número absoluto de cada una de estas subpoblaciones, tres semanas tras la infección con el parásito. En el caso de los ratones C57BL/6 se observó que al igual que ocurre en los ganglios poplíteos, se produce un fuerte reclutamiento de monocitos al PO-LN, lo que se traduce en un aumento significativo del número de moDCs. Asimismo, en los ratones CCR2 KO, se observó un dramático descenso en el reclutamiento de monocitos, y por consiguiente una importante disminución en el número de moDCs. Por tanto, en términos generales podríamos decir que todas las subpoblaciones siguieron una tendencia parecida a la anteriormente observada en los ganglios poplíteos (Figura 13B).

A continuación se estudió la migración de las dDCs desde la epidermis a los ganglios auriculares siguiendo los distintos protocolos descritos en la Figura 13C, es decir, tras 16 horas desde la aplicación de la solución irritante, tras 5 días consecutivos de aplicación o bien tras la aplicación cada 4 días durante dos semanas, en ratones C57BL/6 que habían sido infectados con *L. major* tres semanas antes en la oreja. Tras este análisis se pudo comprobar que el mayor porcentaje de células FITC⁺ se detectó en la población de dDCs, lo que significa que han migrado desde la oreja a través de los vasos linfáticos, y que además se acumulan en el ganglio a lo largo del tiempo, llegando hasta alrededor de un 50% de células FITC positivas tras dos semanas de aplicación del irritante (Figura 13C). También se observó que alrededor

de un 7% de moDCs y un 2% de cDCs y pDCs presentes en los ganglios auriculares estaban marcadas con FITC. Esto podría deberse a la captación de las dDCs presentes en el PO-LN que van muriendo por parte de las moDCs, las cuales resultarían marcadas con FITC.

Posteriormente, se estudio comparativamente el potencial de migración de las dDCs a los ganglios auriculares durante infección por *L. major* en ratones C57BL/6 y CCR2 KO tras la sensibilización de la oreja (Figura 14A). A las 16 horas tras la aplicación de la solución irritante pudimos observar que a pesar de haber menor número de dDCs en los ganglios de los ratones CCR2 KO, el número de dDCs FITC⁺ era similar en ambas cepas, así como el porcentaje que éstas representan del ganglio. En el caso de los ratones tratados durante 5 días consecutivos, observamos que no había diferencias ni en el número total de dDCs en los ganglios auriculares ni en el número de dDCs FITC⁺ entre los ratones C57BL/6 y los ratones CCR2 KO, y que además, en ambos casos se producía una acumulación similar de las dDCs FITC⁺ en el ganglio a lo largo del tiempo. Por otro lado, se analizó la expresión de CCR7, molécula esencial en la migración a través de los vasos linfáticos, en las dDCs presentes en el PO-LN de ambas cepas, a distintos tiempos tras la infección con el parásito. En este análisis pudimos observar, que la expresión de CCR7 en las dDCs los ratones CCR2 KO era algo menor en comparación con la observada en las dDCs de los ratones C57BL/6. En resumen, estos datos apoyan el origen dermal de las dDCs presentes en el ganglio como consecuencia de la migración inducida por el proceso inflamatorio, e indican que en este modelo de sensibilización por contacto presentan un potencial de migración similar en ambas cepas, por lo que se esperaría un número sensiblemente menor en las dDCs presentes en el PO-LN de los ratones CCR2 KO. Esto podría deberse a una mayor acumulación de las dDCs en los CCR2 KO como consecuencia de una mayor tasa de migración en condiciones fisiológicas, es decir, no inducida por la solución irritante. Sin embargo, el análisis de la expresión de CCR7 en las dDCs de los ratones CCR2 KO, no parece apoyar esta hipótesis. Otra posible explicación podría ser que las dDCs en los ratones CCR2 KO presentasen una mayor tasa de proliferación en los PO-LNs durante infección por *L. major*.

Análisis del estado de proliferación de las distintas subpoblaciones de monocitos y DCs durante la infección con *Leishmania major* en ratones C57BL/6

Con la idea de profundizar en la hipótesis expuesta en el apartado anterior, se analizó la tasa de proliferación de las distintas subpoblaciones de monocitos y DCs, tanto en reposo como durante la infección por *L. major* en ratones C57BL/6, por el método de la incorporación de BrdU, tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos.

En primer lugar, se realizó este estudio en las poblaciones de monocitos y DCs presentes en los PO-LNs de ratones C57BL/6 sin infectar y 3 semanas tras la infección, a distintos tiempos

tras la incorporación del BrdU; 4, 16 y 36 horas (Figura 15A). Se observó que a las 4 horas, tan solo el 1% de los monocitos presentan marcaje para BrdU. Este resultado probablemente indica que los monocitos presentes en el PO-LN no proliferan localmente, sino que su reposición proviene de los monocitos migrados desde la médula ósea, ya que a las 16 horas tras la inyección de BrdU, un 34% de los monocitos presentes resultaban positivos para este marcaje. Este porcentaje se redujo al 15% a las 36 horas lo cual podría deberse al recambio celular que presenta esta población y a la falta de BrdU disponible para poder ser incorporado de nuevo. En el caso de las moDCs y las dDCs, no se observó proliferación local ni a 4 horas ni a 16 horas tras la incorporación de BrdU, tan solo a las 36 horas, se observaron moDCs y dDCs BrdU⁺ procedentes de la diferenciación de los monocitos BrdU⁺ reclutados al ganglio. En cuanto a las DCs residentes, las cDCs ya presentaban una tasa de proliferación del 9% en ratones sin infectar y se mantuvo en torno al 10-15%, a los distintos tiempos en los ratones infectados, es decir, su tasa de proliferación no se modificó a raíz de la infección. Las pDCs, que no proliferan en situación de reposo, mostraron un porcentaje alrededor del 14% de células BrdU⁺ a los tres tiempos de estudio.

Seguidamente, se analizó la proliferación de los monocitos y dDCs, que infiltraban la lesión 3 semanas después de la infección tras 4, 16 ó 36 horas tras la inyección de BrdU (Figura 15B). A las 4 horas tras la incorporación de BrdU, tan solo el 1% de los monocitos presentan marcaje para BrdU, indicando que ni los monocitos ni las dDCs se encuentran proliferando localmente. A las 16 horas, sin embargo, el porcentaje de los monocitos aumentaba hasta el 30%. Este dato indica, al igual que observábamos en el PO-LN, que parte de los monocitos que estaban proliferando en la médula ósea, han completado su diferenciación y han migrado a través de la sangre hasta la dermis. Tampoco se observaron células BrdU⁺ entre las dDCs como resultado de la diferenciación de los monocitos BrdU⁺ reclutados a la dermis, a ninguno de los tiempos de análisis. El cálculo del número de dDCs BrdU⁺ a las 16 horas tras la incorporación de BrdU reveló que su porcentaje relativo con respecto al total de dDCs presentes en la dermis, las hace prácticamente indetectables en nuestros experimentos.

Finalmente, se analizaron los monocitos de la médula ósea de ratones C57BL/6 sin infectar y 3 semanas tras la infección, a distintos tiempos tras la incorporación del BrdU; 4, 16 y 36 horas. Los monocitos no vieron incrementada su tasa proliferativa en la médula ósea, debido a la infección por el parásito, siendo de alrededor de un 40% en ambos casos (Figura 15C). Tras su diferenciación los monocitos se extravasan al torrente sanguíneo para migrar a los distintos focos inflamatorios, por ello se analizó la proliferación de esta población a los mismos tiempos descritos anteriormente en la sangre. Se observó que los monocitos que estaban proliferando en la médula ósea (por tanto, BrdU⁺), podían encontrarse en la circulación sanguínea a las 16 horas y cuyo porcentaje de BrdU estaba entorno al 27% (Figura 15D), lo cual concuerda con el porcentaje de monocitos BrdU⁺ reclutados a la dermis y al PO-LN a este mismo tiempo de

estudio. Estos datos sugieren que los monocitos completan su diferenciación en la médula, y se extravasan al torrente sanguíneo para su reclutamiento a los distintos focos inflamatorios.

En conclusión, estos resultados indican que durante la infección por *Leishmania major* ni los monocitos ni las mDCs y dDCs proliferan localmente en ninguno de los focos inflamatorios, y por tanto la reposición de las mDCs del PO-LN y de las dDCs de la dermis proviene de los monocitos reclutados a ambas localizaciones. Sin embargo, las DCs residentes, es decir, las pDCs y cDCs, si aumentan su tasa de proliferación a consecuencia de la infección. Por otra parte, estos datos sugieren que las dDCs del PO-LN no derivan de la diferenciación de pre-DCs, ya que su tasa de proliferación no se corresponde a la observada en las cDCs, que derivan de pre-DCs, que incluso proliferan en situación de reposo.

En resumen, los datos obtenidos en los experimentos realizados con los ratones CCR2 KO y los ensayos de transferencia de monocitos, así como los datos resultantes de los experimentos de migración y del análisis de la tasa de proliferación, parecen apuntar a que durante infección por *L. major*, las dDCs presentes en el PO-LN, derivan de dDCs generadas en la dermis a partir de los monocitos reclutados, y que posteriormente migran a través de los vasos linfáticos hasta el PO-LN.

Análisis de los factores implicados en la diferenciación *in vivo* de monocitos a DCs en la dermis y en los ganglios poplíteos de ratones C57BL/6 durante la infección con *Leishmania major*

Distintos grupos han descrito la importancia de la señalización a través del receptor Flt3, en la diferenciación y homeostasis del linaje de DCs en situación de reposo (D'Amico and Wu, 2003); (Waskow et al., 2008), sin embargo, su posible implicación en el mantenimiento y generación de DCs durante condiciones inflamatorias, continua sin estar resuelta. Por otra parte, aunque múltiples estudios realizados *in vitro* han abordado el papel de diferentes citoquinas y factores de crecimiento en la diferenciación de monocitos a DCs (revisado en (van de Laar et al., 2012); (Zhan et al., 2012)), continúan sin estar esclarecidos cuales son los mediadores locales implicados en el proceso de diferenciación de estos monocitos a las distintas subpoblaciones de DCs *in vivo*, tanto en homeostasis como durante situaciones inflamatorias o procesos infecciosos. Por este motivo, decidimos abordar estas cuestiones mediante el uso de ratones deficientes para estas citoquinas esenciales en la biología de las DCs. Para ello, utilizamos ratones deficientes en la cadena β del receptor de GM-CSF, y ratones deficientes en el receptor Flt3, en comparación con los ratones C57BL/6, en los que se analizaron las poblaciones de monocitos y DCs tanto en la dermis como en los ganglios poplíteos 9 días tras la inoculación de *L. major* en la almohadilla plantar.

El análisis de los PO-LNs de ratones GM-CSFR KO, reveló que no había diferencias significativas en cuanto al número absoluto ni de monocitos ni de ninguna de las subpoblaciones de DCs, cuando se compararon con los PO-LNs de los ratones C57BL/6 (Figura 16). La única población que resultó afectada, tal y como ha sido previamente descrito (Robb et al., 1995), fueron los eosinófilos, que sufrieron una notable reducción en los ratones GM-CSFR KO. En cuanto a los ratones Flt3 KO, se observó un significativo aumento en el número absoluto de moDCs y dDCs, en comparación tanto con los ratones C57BL/6 como con los ratones GM-CSFR KO. En lo que se refiere a los monocitos, no se observaron diferencias significativas con respecto a los ratones C57BL/6, pero si en comparación con los ratones GM-CSFR KO. El número absoluto de cDCs no presentó diferencias significativas entre las distintas cepas, no obstante, el número absoluto de pDCs resultó ligeramente disminuido en comparación con el de los ratones C57BL/6. Este defecto en el número de pDCs y cDCs en el bazo de los ratones Flt3 KO, ha sido descrito con anterioridad en otro trabajo (Waskow et al., 2008).

A continuación se analizó el número absoluto de las poblaciones que infiltran la dermis de estos ratones, 9 días tras la infección con el parásito. En cuanto a los ratones GM-CSFR KO, de acuerdo con lo previamente descrito (Robb et al., 1995), observamos el defecto que presentan en el número de eosinófilos hallados en la dermis. En lo que se refiere a los ratones Flt3 KO, se observó un importante aumento en el número de monocitos, dDCs, eosinófilos y neutrófilos presentes en la dermis, en comparación con el número calculado en las otras dos cepas estudiadas (Figura 17). Cabe destacar que para la realización de estos experimentos, se utilizaron ratones Flt3 KO de 5 semanas de edad, ya que los defectos derivados de la ausencia del receptor Flt3, son más acusados en animales jóvenes (Dakic et al., 2004), por ese motivo la respuesta inmune de estos ratones contra el *L. major* podría verse alterada. En conclusión, estos resultados ponen de manifiesto que la diferenciación de monocitos a moDCs en el PO-LN y la diferenciación de monocitos a dDCs en la dermis, no se ve afectada por la señalización a través del receptor de GM-CSF en el modelo de infección con *L. major*, ya que no se observan diferencias significativas en los números absolutos de dichas poblaciones. En lo que respecta a los ratones Flt3 KO, tampoco parece haber un defecto en la diferenciación de monocitos a DCs en ambas localizaciones durante la infección por el parásito. En resumen, estos datos indican que no hay defectos en la generación de ninguna de las poblaciones celulares existentes en los PO-LNs y en la dermis de los ratones GM-CSFR KO ni en los ratones Flt3 KO durante infección con *L. major*.

Aunque los resultados anteriormente mostrados, no apuntan a que la citoquina GM-CSF tenga un papel en la diferenciación *in vivo* de monocitos a DCs durante la infección por *L. major*, no podemos descartar que se produzca un efecto compensatorio debido a la acción de IL-3, ya que a pesar de que la cadena β del receptor de GM-CSF es común para los receptores de IL-3 e IL-5 (Martinez-Moczygemba and Huston, 2003), IL-3 posee una segunda subunidad

β específica, que junto a la subunidad α pueden promover la señalización inducida por IL-3 en ausencia del receptor de GM-CSF (Nishinakamura et al., 1995). Para abordar esta cuestión, se infectaron ratones C57BL/6 y GM-CSFR KO durante 9 días con *L. major*. Estos animales se trataron con 40 μ g del anticuerpo α -IL-3 o su control de isotipo correspondiente, durante los 6 días anteriores al análisis de las células que infiltran la dermis y que se encuentran en los PO-LNs de estos animales, de acuerdo con el protocolo descrito en la Figura 18.

El análisis de los PO-LNs, no mostró diferencias significativas en el número absoluto de las distintas poblaciones de monocitos y DCs, entre los ratones tratados con el anticuerpo anti-IL-3 y aquellos tratados con el anticuerpo control. En este estudio volvimos a observar el defecto en el número absoluto de eosinófilos presentes en el PO-LN, de los ratones GM-CSFR KO frente a los ratones C57BL/6 (Figura 18).

Seguidamente, el análisis de las células que infiltran la lesión, reveló que no se producían cambios importantes en el número absoluto de monocitos y DCs, en los ratones GM-CSFR KO tratados con el anticuerpo anti-IL-3 en comparación con aquellos tratados con el anticuerpo control. De la misma manera, tampoco se observaron diferencias en el número de eosinófilos y neutrófilos (Figura 19). Los datos obtenidos en esta experimentación parecen excluir una posible implicación de GM-CSF e IL-3 en la diferenciación *in vivo* de monocitos a mDCs en el PO-LN, así como en la diferenciación de monocitos a dDCs en la dermis, durante la infección con el parásito *L. major*. En conclusión, estos datos parecen indicar que ni la señalización a través del receptor de Flt3, ni la señalización mediada por GM-CSF o IL-3 a través de la cadena β común del receptor de GM-CSF, están implicadas en el proceso de diferenciación *in vivo* a DCs de los monocitos reclutados tanto a la dermis como al PO-LN de los ratones infectados.

Los resultados derivados del estudio de los ratones GM-CSF KO y Flt3 KO contrastan con lo descrito anteriormente en cuanto al potencial de GM-CSF para diferenciar en un sistema *in vitro*, monocitos o precursores de la médula ósea a DCs inmaduras (Fleetwood et al., 2007). Asimismo, discrepan en cuanto al factor M-CSF, ya que resulta esencial en el desarrollo y diferenciación del linaje monocítico y experimentos *in vitro* han demostrado su capacidad para diferenciar monocitos a células con un fenotipo similar al de los macrófagos. Con el fin de explorar el efecto de *Leishmania major* sobre la diferenciación *in vitro* de monocitos, éstos se aislaron de la médula ósea de ratones C57BL/6 y fueron cultivados *in vitro* con GM-CSF o M-CSF durante 24 horas. Estos experimentos se realizaron en presencia o ausencia de los distintos estadios que presenta el parásito *Leishmania major* durante su ciclo vital, es decir, promastigotes o amastigotes. Se caracterizaron las células derivadas de la diferenciación *in vitro* de los monocitos por citometría de flujo, en base a los niveles de expresión de distintas moléculas; MHC-II, CD11c, Ly6C y F4/80, y a su vez se analizó el grado de infección de dichas células, mediante el uso del parásito que expresa la proteína fluorescente DsRed (Figura 20A).

En este estudio, pudimos observar que los monocitos diferenciados en presencia de M-CSF, daban lugar a células con un fenotipo similar al de un macrófago, caracterizado por altos niveles de expresión de Ly6C y F4/80 y ausencia de expresión de MHC-II y CD11c. Mientras que los monocitos en presencia de GM-CSF se diferenciaban en DCs, caracterizadas por los altos niveles de expresión de MHC-II y CD11c y niveles más bajos de Ly6C y F4/80 que los macrófagos. En el caso de los monocitos cultivados únicamente en presencia del parásito, presentaron un fenotipo más similar al de un macrófago o monocito activado. Cabe destacar que la diferenciación de los monocitos en presencia de GM-CSF o M-CSF, para dar lugar a DCs o macrófagos, respectivamente, no se vio alterada por la presencia de los amastigotes de *L. major* Red durante el periodo de cultivo.

Puesto que tanto los monocitos como las moDCs son las poblaciones preferentemente infectadas *in vivo* por *L. major*, analizamos si resultaban infectadas en estos experimentos *in vitro* mediante microscopía confocal (Figura 20B). Con este fin se analizó la internalización del parásito en cultivos *in vitro* de monocitos diferenciados a DCs en presencia de GM-CSF durante 16 horas en presencia de amastigotes de *L. major* marcados con CFSE o promastigotes de *L. major* Red. Tras este periodo de cultivo, se separaron las distintas poblaciones de monocitos y DCs, mediante separación inmunomagnética mediante incubación secuencial con mAb anti-CD11c y/o mAb anti-CD11b conjugados con biotina y microesferas conjugadas con estrepto-avidina (MACS). En estos experimentos pudimos observar que tanto los monocitos como las DCs son infectados por las dos formas que presenta el parásito, es decir, amastigote y promastigote.

En cuanto al grado de infección, en los tres casos, es decir, con GM-CSF, M-CSF o sin estímulo, fue muy parecido, entorno al 70-80%. Por otro lado, estos mismos experimentos realizados en presencia de promastigotes de *L. major* Red, dieron lugar a resultados semejantes a los obtenidos con los amastigotes (Figura 21A). Es interesante resaltar que en todas las condiciones analizadas, la presencia de *L. major* en el cultivo aumentó la supervivencia en cultivo de los monocitos, las DCs o los macrófagos (Figura 21B).

En resumen, estos datos indican que la diferenciación *in vitro* de monocitos a DCs o de monocitos a macrófagos en presencia de GM-CSF o M-CSF, respectivamente, no se ve bloqueada por ninguna de las dos formas que presenta el parásito, y además estos resultados parecen sugerir que su presencia aumenta la viabilidad de las células presentes en el cultivo. Por otro lado, tanto los monocitos como las DCs y macrófagos derivados de los mismos pueden ser infectados por ambas formas del parásito *L. major*.

ANÁLISIS DE LA DIFERENCIACIÓN DE MACRÓFAGOS DURANTE LA INFECCIÓN CON *LEISHMANIA MAJOR*.

Potencial de los monocitos como precursores de macrófagos *in vivo* durante infección por *Leishmania major*

M-CSF es un factor esencial en la generación y mantenimiento del linaje fagocítico mononuclear, entre los que se encuentran los monocitos y los macrófagos titulares (Hamilton, 2008). Varios estudios recientes, sugieren que M-CSF participa en la regulación de las etapas tardías del desarrollo de los macrófagos tisulares, en lugar de actuar sobre sus progenitores hematopoyéticos en la médula ósea (MacDonald et al., 2010); (Lenzo et al., 2012). Por otra parte, muy poco trabajos han abordado el potencial de los monocitos para generar macrófagos durante situaciones inflamatorias debidas a la infección por un patógeno (Getts et al., 2008). Por ese motivo, una de las cuestiones que intentamos abordar fue la posible contribución de los monocitos inflamatorios reclutados al PO-LN a la generación de las distintas subpoblaciones de macrófagos presentes en los PO-LNs durante la infección por *L. major*. Para ello, dada la dificultad que entraña la detección por citometría de flujo de las distintas subpoblaciones de macrófagos, la identificación se llevó a cabo por métodos inmunohistoquímicos sobre cortes de criostato de PO-LN de ratones infectados durante 9 días con el parásito, y que fueron analizados mediante microscopía confocal.

En primer lugar, se identificaron dos de las principales poblaciones presentes en los PO-LNs de ratones C57BL/6 tras 9 días de infección con el parásito. En las zonas corticales de las secciones pudimos caracterizar los macrófagos del seno subcapsular, que se definen por expresar altos niveles de la molécula CD169 y no expresar la molécula SIGNR1. También se caracterizaron los macrófagos de los senos medulares, que coexpresan las moléculas CD169 y SIGNR1 (Gray and Cyster, 2012). Además, se hicieron tinciones del marcador CD68, que es una glicoproteína expresada en los gránulos citoplasmáticos de distintas células fagocíticas (Figura 22).

Tras el estudio de los macrófagos en secciones de PO-LNs de ratones C57BL/6 infectados con *L. major*, analizamos los PO-LNs de ratones CCR2 KO con el fin de estudiar la contribución de los monocitos a la generación de macrófagos de *nov*o durante la infección por el parásito. Pudimos observar que no había diferencias significativas en las subpoblaciones de macrófagos presentes en el área cortical o medular del PO-LN de los ratones CCR2 KO (Figura 23). Por otro lado, decidimos también abordar si la generación o mantenimiento de estos macrófagos durante el proceso inflamatorio inducido por la infección, estaba mediado por la citoquina GM-CSF. Para ello, realizamos este mismo tipo de tinción en los PO-LNs de ratones deficientes para la cadena β del receptor de GM-CSF, utilizados anteriormente. Los resultados obtenidos, parecen indicar que GM-CSF, no está implicado en la generación y/o mantenimiento de

ninguna de las dos poblaciones de macrófagos identificadas en los PO-LNs, ya que los datos obtenidos son similares a los observados en los ratones C57BL/6 (Figura 24).

En conclusión, estos datos sugieren que los monocitos no actúan como precursores *in vivo* de los macrófagos inflamatorios generados a consecuencia del proceso inflamatorio desencadenado tras la infección con *L. major* y que además, la señalización a través del receptor de GM-CSF tampoco parece tener un papel en este proceso.

DISCUSIÓN

Durante el desarrollo de este trabajo, nos hemos centrado en intentar contestar diversas cuestiones que afectan a la diferenciación de las células dendríticas durante procesos infecciosos, tales como; la contribución de los monocitos a la generación de los distintos tipos de DCs durante procesos infecciosos en los ratones deficientes para CCR2, el origen de las DCs dermales presentes en el PO-LN, los factores que determinan la diferenciación de *novo* de DCs derivadas de monocitos o el potencial de los monocitos para la diferenciación en macrófagos inflamatorios. Para tratar de abordar estos objetivos, hemos utilizado el modelo de infección murina con el parásito *Leishmania major*, anteriormente estudiado en nuestro laboratorio, en el que la infección por vía subcutánea en la almohadilla plantar con el parásito, induce un fuerte reclutamiento de monocitos tanto al sitio de infección, como a los ganglios poplíteos drenantes, así como un fuerte incremento en las distintas poblaciones de DCs presentes en ambas localizaciones.

Los monocitos como precursores de DCs inflamatorias inducidas por infección

El concepto relativo al reclutamiento de precursores de DCs, así como, a la generación de *novo* y acumulación de DCs tanto en los órganos linfoides como en los diferentes tejidos periféricos que se produce durante diversos procesos infecciosos, ha sido ampliamente revisado (Leon and Ardavin, 2008b). En nuestro modelo de infección por *Leishmania major*, el análisis del número absoluto de monocitos y DCs presentes en la dermis y en los PO-LNs, tras la infección con el parásito, en comparación con el número de células halladas en estas mismas localizaciones en situación de reposo, mostraron claramente que se produce un fuerte incremento en el número absoluto de DCs debido a la reacción inflamatoria inducida por la infección.

El potencial de los monocitos como precursores de DCs *in vivo* durante procesos infecciosos, al igual que el concepto de diferenciación local de los mismos, fue inicialmente descrito en trabajos basados en el modelo de infección del bazo por *Listeria monocytogenes* (Serbina, Immunity, 2003; Serbina, Nat Immunol, 2006), y por estudios previos realizados en nuestro laboratorio utilizando el modelo de infección por *Leishmania major* (Leon et al., 2007), y posteriormente, ha sido establecido en muchos otros modelos de infecciones virales y bacterianas (Dominguez and Ardavin, 2010). Nuestros datos a este respecto, basados en el análisis de las cinéticas de los monocitos y DCs presentes en la dermis y el PO-LN de los ratones CCR2 KO, así como los ensayos de transferencia de monocitos, ponen de manifiesto que tanto las dDCs diferenciadas en la dermis, como las moDCs diferenciadas en los PO-LNs derivan de los monocitos reclutados a dichas zonas. Estos datos corroboran la idea de que los monocitos pueden actuar como precursores de DCs *in vivo* durante procesos infecciosos, diferenciándose localmente en los distintos focos inflamatorios.

El estudio detallado de las variaciones en el número de monocitos y DCs que se da tras la infección con el parásito, reveló que la proporción relativa DC/monocito en la dermis era mucho mayor que la observada en el PO-LN. Además, la acumulación de monocitos a lo largo del periodo de estudio, nos permitió hacer cálculo aproximado de la tasa de reclutamiento tanto a la dermis como al PO-LN. Con estos datos pudimos hacer una estimación del tiempo de transición de monocito a DC en ambas localizaciones, que mostró que dicha transición es más rápida en la dermis que en el PO-LN. Además, los experimentos de transferencia intravenosa de monocitos apoyaron esta hipótesis, ya que 12 horas tras la transferencia, casi la totalidad de los monocitos transferidos y reclutados a la dermis se han diferenciado a dDCs mientras que a este mismo tiempo tan solo el 5% de los monocitos transferidos y reclutados al PO-LN se ha diferenciado a moDC, y hasta pasadas 72 horas no se observa la totalidad de los monocitos diferenciados en el PO-LN. Si bien se debe ser precavido en cuanto a la interpretación de estos datos debido a las limitaciones de dicha aproximación, los resultados parecen sugerir que existen una diferencia notable en el tiempo de diferenciación de monocito a moDC en el PO-LN en comparación con el observado en la dermis de monocito a dDC y que estaría condicionado por el entorno inflamatorio particular de cada uno de los focos infecciosos.

Efecto de la deficiencia de CCR2 sobre el reclutamiento de monocitos y la generación de DCs inflamatorias durante infección con *Leishmania major*

Con el fin de profundizar en el origen de las distintas subpoblaciones de DCs identificadas en la dermis y en los PO-LNs y en la contribución relativa a este proceso de los monocitos y pre-DCs, se utilizó este mismo modelo de infección por *Leishmania major* en los ratones deficientes para el receptor CCR2. Estudios previos han analizado el defecto que presentan estos ratones en distintos modelos de infecciones bacterianas como, por ejemplo, durante infección por *Listeria monocytogenes* (Serbina and Pamer, 2006) o *Mycobacterium tuberculosis* (Peters et al., 2004), en modelos de infecciones protozoarias como *Toxoplasma gondii* (Dunay et al., 2008) o *Trypanosoma brucei* (Bosschaerts et al., 2010), en modelos de infecciones fúngicas como *Aspergillus fumigatus* (Hohl et al., 2009), también durante infecciones víricas como citomegalovirus murino (MCMV) (Crane et al., 2009) o el virus de la gripe (Aldridge et al., 2009) y durante procesos inflamatorios no patogénicos, como durante aterosclerosis (Swirski et al., 2007). En nuestro modelo, pudimos observar que estos animales presentan una drástica disminución en el reclutamiento de monocitos, tanto al sitio de infección como a los ganglios poplíteos drenantes. Además, el análisis de las cinéticas mostró que la fuerte reducción en el número de monocitos, se correspondía con una dramática disminución en el número de moDCs y dDCs, en el PO-LN y la dermis respectivamente. Estos datos indicaron, de acuerdo con estudios previos (Leon et al., 2007), que ambas poblaciones derivaban de la diferenciación local de estos monocitos inflamatorios.

En el modelo de infección con *Leishmania major* se ha descrito la presencia de TipDCs, responsables de la producción de TNF- α y óxido nítrico (NO), tanto en el sitio de infección como en los PO-LNs (De Trez et al., 2009). Estas TipDCs son fenotípicamente muy similares a las moDCs caracterizadas en nuestros PO-LNs, salvo que en nuestro caso, no observamos la expresión de iNOS en las moDCs del PO-LN, pero sí en las dDCs de la dermis. En este mismo estudio, la infección de los ratones deficientes para CCR2, da lugar a una notable reducción en el número de TipDCs en el PO-LN. Este dato se correspondería de nuevo con la fuerte disminución observada en nuestro caso, en las moDCs del PO-LN. Sin embargo, hay cierta discrepancia en cuanto a la producción de NO (medida por la expresión de iNOS), ya que en nuestro caso solo se observa en las dDCs de la dermis y no en las moDCs del PO-LN. Aunque tomados con mucha precaución, nuestros datos podrían sugerir que el entorno inflamatorio de cada una de las zonas de infección podría condicionar la adquisición de una especialización funcional distinta para las dDCs frente a las moDCs, acordes con las necesidades de cada contexto inflamatorio. A este respecto, en el modelo de infección por *Mycobacterium tuberculosis* comentado con anterioridad, se ha propuesto que el reclutamiento de los monocitos, en este caso al pulmón y a los ganglios linfáticos correspondientes, activa distintos programas de especialización funcional de los monocitos diferenciados (Skold and Behar, 2008). En nuestro caso particular, el reclutamiento de monocitos a la dermis da lugar a dDCs, que participan en la respuesta innata contra el parásito mediante la producción de NO, con el fin de contener la diseminación de la infección. Mientras que los monocitos reclutados al PO-LN, dan lugar a moDCs, que mediante la producción de IL-12 participan en la inducción de la polarización de la respuesta adaptativa hacia un entorno de tipo Th1.

Por otra parte, debido a que la proporción relativa dDC/monocito de la dermis de estos ratones presentaba una gran diferencia en comparación la observada para los ratones C57BL/6, nos planteamos que además de un defecto en el reclutamiento de los monocitos a los órganos linfoides y a las áreas inflamadas, CCR2 pudiese estar implicado en el proceso de diferenciación de monocitos a dDCs en la dermis durante infección por *Leishmania major*. Experimentos *in vitro* en los que monocitos de los ratones CCR2 KO fueron aislados de la médula ósea y puestos en cultivo en presencia de GM-CSF, dieron lugar a moDCs en una proporción y con unas características similares a las de los monocitos de los ratones C57BL/6. Este hecho apunta a que al menos la diferenciación *in vitro* de monocitos CCR2 KO a moDCs no parece estar afectada. Además existen evidencias experimentales descritas en modelos *in vivo* durante distintos procesos infecciosos que apoyan esta hipótesis. La transferencia adoptiva de monocitos CCR2 KO en ratones C57BL/6 infectados con *Listeria monocytogenes*, mostraron que la migración de dichos monocitos desde el torrente sanguíneo hasta el bazo era independiente de CCR2 y que además 12 horas tras la transferencia estas células presentaban una morfología similar a las TipDCs y eran capaces de expresar iNOS (Serbina and Pamer, 2006). Asimismo, en otro modelo de infección por *Mycobacterium tuberculosis*, los monocitos CCR2 KO transferidos por vía intravenosa eran reclutados al pulmón y se diferenciaban a DCs

MHC-II⁺, CD11c⁺ y MAC-3⁺, al igual que ocurría con los monocitos de ratones control (Skold and Behar, 2008). Por tanto, los defectos observados en los ratones CCR2 KO durante la infección por *Leishmania major*, parecen no ser debidos a una incorrecta diferenciación de los monocitos, aunque esta hipótesis deberá ser validada *in vivo* en nuestro modelo de infección en futuros experimentos.

En lo que respecta a la respuesta inmune de los ratones CCR2 KO frente a la infección por el parásito *Leishmania major*, ya ha sido previamente estudiada por otros grupos. En concreto, el trabajo realizado por el grupo de Ahuja SS. (Sato et al., 2000) demostró que estos ratones, a pesar de tener un fondo genético resistente a la infección, presentan una hiperproliferación de células B, una infiltración continuada de neutrófilos y una respuesta polarizada hacia un entorno Th2 que los hace susceptibles a la infección. Sin embargo, en este trabajo, asocian ese fenotipo susceptible al bloqueo que sufren las LCs para migrar desde la oreja a los ganglios linfáticos, a pesar de no observar una reducción en el número de LCs en la epidermis, y a una reducción en las DCs CD8⁺ presentes en el bazo y principales inductoras de la respuesta de tipo Th1. Estos datos se oponen a lo observado en el desarrollo de esta tesis, ya que en nuestro caso, el principal defecto observado en la dermis de estos ratones deficientes, es la gran reducción de monocitos reclutados y de dDCs inflamatorias derivadas de los mismos, las cuales son las principales responsables del inicio de la respuesta de tipo Th1 específica contra el parásito (Leon et al., 2007). Además estudios más recientes, estarían en concordancia con estos resultados, ya que apuntan a que las LCs actúan como reguladores negativos de la respuesta inmune contra *Leishmania major* (Ritter et al., 2004); (Kautz-Neu et al., 2011).

Subpoblaciones y origen de las células dermales en la dermis y de las que se denominan dermales en los ganglios periféricos.

Tal y como se ha comentado anteriormente las DCs presentes en la dermis en situación de reposo incluyen DCs residentes que pueblan la dermis y LCs migratorias presentes en la epidermis. Dentro de las DCs dermales residentes, podemos encontrar dos subpoblaciones principales, las DCs CD103⁺ langerina⁺, que representan entre un 10-20% del total, y las DCs CD11b⁺ langerina⁻, que representan alrededor del 70% (Merad et al., 2008). Experimentos de transferencia adoptiva, han demostrado que las pre-DCs son capaces de dar lugar tanto a la subpoblación de DCs CD103⁺ como a la CD11b⁺ en distintos tejidos no linfoides mientras que los monocitos sólo contribuyen a la población CD11b⁺ (Ginhoux et al., 2009). Sin embargo, no ha sido posible detectar estas pre-DCs transferidas o las DCs derivadas de las mismas en la dermis, debido al bajo rendimiento de las células recuperadas de la piel, por ello la contribución exacta de los monocitos y las pre-DCs a las distintas poblaciones de DCs dermales, continua sin estar esclarecida. Sin embargo, durante situaciones inflamatorias, la composición de las

DCs de la dermis cambia notablemente, pudiendo llegar a desaparecer las DCs residentes y siendo éstas reemplazadas por DCs inflamatorias derivadas de monocitos (Helft et al., 2010). Nuestros resultados obtenidos en los ratones CCR2 KO claramente sugieren que la mayoría de dDCs presentes en la dermis, se originan a partir de los monocitos reclutados y diferenciados localmente como consecuencia del proceso inflamatorio producido por la infección con *L. major*. Nuestro estudio fenotípico de los monocitos y dDCs presentes en la dermis muestran que, los monocitos reclutados durante la infección expresan altos niveles de Ly6C, sin embargo, una vez diferenciados a dDCs, dejan de expresar este marcador, lo que las hace indistinguibles de las DCs CD11b⁺ residentes, que se caracterizan por expresar niveles altos de CD11c, MHC-II, CD24, F4/80 y Sirp- α .

El estudio de las distintas subpoblaciones de DCs presentes en los PO-LNs de ratones CCR2 KO durante infección por *Leishmania major*, reveló que a pesar de la notable reducción en el número de moDCs en el PO-LN y de las dDCs en la dermis, las dDCs del PO-LN solo presentaban una reducción de entorno al 40%. Los experimentos llevados a cabo mediante la sensibilización de la oreja de ratones CCR2 KO infectados con *L. major*, indican que las dDCs que infiltran la dermis de estos ratones presentan una capacidad migratoria similar a la observada en los ratones C57BL/6, al menos en el modelo de sensibilización por contacto en el que se induce esta migración de manera no fisiológica. Por otro lado, en nuestro modelo de infección, los experimentos de incorporación de BrdU, no parecen indicar que las dDCs presentes en el PO-LN de ratones C57BL/6 proliferen localmente. Sin embargo, estudios recientes han demostrado, que aunque las DCs dermales están continuamente siendo reemplazadas por precursores provenientes de la sangre (Liu et al., 2007), en situación de reposo, presentan cierta tasa de proliferación tanto en la dermis como en los ganglios linfáticos drenantes (Henri et al., 2010). Por el contrario, nuestros datos mostraron que las cDCs se encuentran en continuo estado de proliferación, incluso en ausencia de infección, y en el caso de las pDCs, éstas comenzaron a proliferar localmente como consecuencia de la infección. Estos datos requieren de un estudio más a fondo que se está llevando a cabo actualmente en nuestro laboratorio. Por último, los análisis que abordan el grado de infección de cada una de las poblaciones presentes en la dermis y los PO-LNs de los ratones CCR2 KO, muestran que las dDCs de la dermis presentan un alto grado de infección, lo que puede hacer que su capacidad migratoria se vea alterada. Por tanto, la reducción parcial observada en las dDCs del PO-LN, podría estar explicada por la acumulación de estas células tras migrar al PO-LN, a pesar de que su migración en condiciones fisiológicas pueda estar afectada a consecuencia del mayor grado de infección. Otra posible hipótesis podría ser que su migración no estuviese alterada, pero el nicho que ocupan las dDCs en el PO-LN estuviese afectado o bien, que el recambio celular de esta subpoblación fuese distinto al que presentan las dDCs del PO-LN en los ratones C57BL/6.

En resumen, en nuestro modelo infección por *L. major*, todos estos resultados indican que las

dDCs presentes en el PO-LN provienen de la dermis y por tanto derivan de los monocitos reclutados a la dermis que se diferencian a dDCs con un fenotipo similar a las DCs CD11b⁺ residentes y que además podrían acumularse en los PO-LNs a lo largo del tiempo. En concordancia con esta evidencia, observamos una gran similitud en el fenotipo que presentaban las dDCs de la dermis y las dDCs del PO-LN, el cual es equivalente al que se ha descrito para las denominadas DCs dermales, presentes en los ganglios linfáticos que drenan la piel (Henri et al., 2001). Por lo tanto, apoya la idea de que las dDCs de la dermis derivadas de los monocitos reclutados a esta zona como consecuencia del proceso inflamatorio, son aquellas que posteriormente migran a través de los vasos linfáticos, proceso que conlleva su maduración, hasta llegar a los ganglios poplíteos. Este hecho estaría respaldado por un aumento en el nivel de expresión de MHC-II y la expresión de la molécula de coestimulación CD86, que se observa en las dDCs del PO-LN y que se correlacionan con las características fenotípicas del estado de maduración (Wilson et al., 2003); (Villadangos and Schnorrer, 2007).

Además, la expresión del marcador CCR7 en las dDCs presentes en los PO-LNs respalda la idea del origen dermal de dicha subpoblación, ya éste es el principal receptor implicado en la migración a través de los vasos linfáticos hasta los PO-LNs (Ohl et al., 2004), aunque el nivel de expresión de CCR7 en las dDCs del PO-LN en los ratones CCR2 KO fue un poco más bajo en comparación con el observado en los ratones C57BL/6, probablemente como consecuencia del mayor grado de infección. Este dato, podría sugerir que estas dDCs infectadas migran a los PO-LNs, y favorecen la diseminación de la infección dentro de los ganglios linfáticos, haciendo que la inducción de la respuesta específica contra el parásito sea defectuosa y en último término, polarizando la respuesta hacia un entorno de tipo Th2 y aumentando la susceptibilidad de estos ratones a la infección.

Por ultimo, en cuanto a la función de las dDCs de la dermis, como ya fue descrito en un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio, se ha propuesto que son las principales responsables de la inducción de la respuesta de tipo Th1 específica contra el parásito (Leon et al., 2007). En otro modelo de infección de la piel por el HSV-1, las DCs dermales CD11b⁺ presentaban mayor eficiencia en la presentación de antígenos virales ex vivo a las células T CD4⁺ que el resto de subpoblaciones (Bedoui et al., 2009). Esto mismo también ha sido descrito en un modelo de infección cutánea por *Leishmania*, tras la depleción de las DCs langerina⁺ de la dermis (Brewig et al., 2009). Por otra parte, también se ha propuesto que estas DCs dermales CD11b⁺ juegan un papel muy importante en la expansión local de células T efectoras y T reguladoras (McLachlan et al., 2009).

Citoquinas implicada en la diferenciación de células dendríticas durante procesos infecciosos e inflamatorios

Otro de los objetivos principales de este trabajo ha sido intentar esclarecer cual o cuales son los factores implicados en la regulación de la diferenciación de monocitos a DCs *in vivo* durante procesos infecciosos. Para intentar abordar esta cuestión en nuestro modelo de infección por *Leishmania major*, en el que los monocitos reclutados tanto a la dermis como al PO-LN se diferencian localmente a DCs, hicimos uso de los ratones deficientes para la cadena β del receptor de GM-CSF. GM-CSF es un factor de crecimiento, cuyo potencial para diferenciar células con un fenotipo similar al de una DC inmadura a partir de monocitos murinos, fue descrito en experimentos *in vitro* por el grupo de R. Steinman (Inaba et al., 1992). Estudios posteriores, han mostrado que los niveles de GM-CSF en suero aumentan en ratones en situación de inflamación o durante procesos autoinmunes, y que su bloqueo mediante el uso de un anticuerpo específico, mostraba su contribución a la movilización de monocitos y neutrófilos desde la médula ósea (Hamilton, 2008); (Cook et al., 2011). Otro trabajo donde se describen las diferentes poblaciones de DCs de la lamina propia concluye que las DCs CD11b⁺ CD103⁺ son dependientes de GM-CSF en situación de reposo (Bogunovic et al., 2009). Así mismo, en un modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental, se describe que GM-CSF está implicado en la acumulación de las DCs dermales CD103⁺ langerina⁺ en los ganglios linfáticos que drenan la piel tanto en reposo como durante inflamación (King et al., 2010). Posiblemente debido a todas estas evidencias se haya asumido (Zhan et al., 2012), aunque no demostrado, que GM-CSF también controla la diferenciación *in vivo* de las DCs derivadas de monocitos. Nuestros experimentos mostraron que no había ningún defecto en la diferenciación de las moDCs en el PO-LN, así como tampoco lo había en las dDCs de la dermis. Tan solo se vieron afectados los eosinófilos presentes en ambas localizaciones, tal y como se ha descrito previamente (Robb et al., 1995). Estos datos están en concordancia con un trabajo recientemente publicado en el que se describe que la señalización a través del receptor de GM-CSF, es necesaria para el desarrollo de las DCs de los tejidos no linfoides, como el pulmón, la dermis, la lamina propia, el hígado y el riñón, durante homeostasis pero no durante inflamación en distintos modelos de infección aguda (Greter et al., 2012a). También se realizaron experimentos en ratones GM-CSFR KO en los además se bloqueó la citoquina IL-3 con un anticuerpo específico, ya que IL-3 posee un receptor específico cuya señalización podría enmascarar el efecto inducido por la ausencia del receptor de GM-CSF. Estos estudios revelaron que IL-3 tampoco parece tener un papel en la diferenciación *in vivo* de monocitos a DCs durante infección por *Leishmania major*.

Por otra parte, otros estudios han demostrado que la citoquina M-CSF podría tener un papel en el desarrollo de las DCs de algunos tejidos no linfoides. Experimentos de reconstitución de médula ósea a partir de ratones deficientes en el receptor de M-CSF, muestran que la generación de las LCs es dependiente de dicha citoquina (Ginhoux et al., 2006). En otro trabajo

se describe que en situación de reposo los ratones deficientes en el receptor de M-CSF, presentan un defecto en la población de DCs CD11b⁺ presentes en el riñón y en el pulmón (Ginhoux et al., 2009). Más recientemente, en el estudio anteriormente comentado (Greter et al., 2012a) se ha propuesto que M-CSF es el factor responsable de la diferenciación *in vivo* de las DCs inflamatorias en un modelo de infección por el virus de la gripe y en ratones tratados con LPS.

La señalización de Flt3L a través de su receptor Flt3, es esencial durante el desarrollo temprano de las DCs a partir de sus precursores hematopoyéticos y en el mantenimiento de la homeostasis de las DCs en los tejidos linfoides. En situación de reposo, los ratones deficientes para Flt3 o su ligando, Flt3L, presentan una fuerte reducción en el número de pDCs o cDCs tanto en los órganos linfoides como en los órganos no linfoides (Watowich and Liu, 2010). En situación de inflamación, como la producida a consecuencia de la irradiación, los niveles de Flt3L aumentan en suero de manera drástica. Las células estromales pueden favorecer el incremento de los niveles de FLt3L, contribuyendo así la reposición de las DCs a partir de sus progenitores hematopoyéticos en los órganos linfoides (Kenins et al., 2008). Para abordar su posible implicación en la diferenciación de DCs durante la infección con *L. major*, se infectaron ratones deficientes para el receptor Flt3. Los datos obtenidos, no sugieren que la señalización a través de este receptor esté implicada en este proceso. Varios trabajos han puesto de manifiesto, que los ratones deficientes en el receptor Flt3 presentan una reducción en el número de cDCs y pDCs en los tejidos linfoides, sin embargo, esta reducción es más acusada en los ratones deficientes en el ligando de Flt3, lo cual sugiere la existencia de un segundo receptor para dicha citoquina (McKenna et al., 2000); (Waskow et al., 2008); (Kingston et al., 2009). Por este motivo, quizás sería más interesante abordar la generación de las DCs inflamatorias *in vivo* en los ratones deficientes para el ligando de Flt3.

Diferenciación de macrófagos durante procesos inflamatorios

Numerosos son los estudios que han puesto de manifiesto el potencial de los monocitos como precursores de DCs tanto durante homeostasis como durante procesos inflamatorios asociados a diferentes infecciones microbianas, así como en situaciones inflamatorias no patogénicas (Shi and Pamer, 2011). Nosotros mismos, a lo largo del desarrollo de esta tesis, hemos pretendido responder diversas cuestiones que conciernen a dicho proceso de diferenciación *in vivo* de monocitos a DCs en el modelo de infección de *Leishmania major*. Distintos estudios han reflejado el potencial de los monocitos como precursores de macrófagos en situación de reposo. En el pulmón se ha propuesto que los monocitos Ly6C^{hi}, se diferencian en macrófagos en el parénquima pulmonar para luego dar lugar a los macrófagos alveolares (Landsman and Jung, 2007). Otro estudio más reciente, describe que en homeostasis, los monocitos Ly6C^{hi} se diferencian en macrófagos antiinflamatorios en la lámina propia, mientras que en el modelo de

colitis, se diferencian principalmente a DCs inflamatorias (Rivollier et al., 2012). Sin embargo, son pocos los trabajos que se han centrado en describir el potencial de los monocitos como precursores de macrófagos durante procesos infecciosos. En un modelo de infección por *Citrobacter rodentium*, la producción de CCL2 promueve el reclutamiento de monocitos a la lámina propia que se diferencian en macrófagos inflamatorios (Kim et al., 2011).

En nuestro caso, para tratar de abordar esta cuestión utilizamos nuestro modelo de infección en los ratones CCR2 KO, que como previamente hemos descrito sufren una fuerte reducción en el número de monocitos reclutados al PO-LN, para ver su contribución a la generación de macrófagos. En los ganglios linfáticos, se han descrito 3 poblaciones principales de macrófagos; los macrófagos de la zona subcapsular (SSMs), caracterizados por la expresión de las moléculas CD169 y CD11b, y por no expresar F4/80, los macrófagos de los senos medulares (MSMs), que expresan los siguientes marcadores: CD169, CD11b, SIGNR1 y F4/80, y los macrófagos de los cordones medulares (MCMs), que no expresan CD169 pero si las moléculas CD11b y F4/80 (Gray and Cyster, 2012). Ante la dificultad que conlleva la detección por FACs de las distintas subpoblaciones de macrófagos, su identificación se llevó a cabo mediante métodos inmunohistoquímicos sobre cortes de criostato de los PO-LNs tras 9 días de infección con el parásito y posterior detección por microscopía confocal. En nuestros análisis, pudimos distinguir los SSMs que se localizaban en las zonas corticales del PO-LN y los MSMs situados en la zona medular, en base a algunos de los marcadores anteriormente descritos. Las tinciones realizadas en los PO-LNs de los ratones CCR2 KO, sugieren que los monocitos no parecen tener una función en la diferenciación de las distintas poblaciones de macrófagos durante infección con *Leishmania major*. En este sentido, otros estudios han propuesto que, bajo situaciones inflamatorias como las que se dan en un modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (Ajami et al., 2011) o en un modelo de inflamación aguda del peritoneo (Davies et al., 2011), los monocitos reclutados al foco inflamatorio tan solo contribuyen a la repoblación de los macrófagos residentes de manera temporal, y son los propios macrófagos residentes los encargados de restablecer la homeostasis del tejido mediante proliferación local. Sin embargo, una opción que no podemos descartar, es que estos macrófagos se repueblen únicamente mediante proliferación *in situ*, tal y como ha sido descrito en un modelo de infección por helmintos que promueve una respuesta de tipo Th2, en el que la acumulación de macrófagos es debida a la proliferación local de los macrófagos residentes (Jenkins et al., 2011). Para responder a este problema, diversos experimentos están en curso actualmente en nuestro laboratorio.

En conclusión, estos datos apuntan a que en el caso de la infección con el parásito *Leishmania major*, estos monocitos actúan como precursores de DCs *in vivo* preferentemente y su contribución a la generación de macrófagos inflamatorios está siendo abordada en estos momentos mediante experimentos de transferencia de monocitos y posterior detección mediante microscopía confocal.

Por otra parte, también quisimos abordar que factores podían ser los responsables de la diferenciación *in vivo* de los macrófagos durante la respuesta inmune contra *L. major*, para ello, se realizaron experimentos utilizando los ratones deficientes en el receptor GM-CSF y ratones tratados con el anticuerpo anti-MCSFR por vía intraperitoneal durante 9 días. La fuerte reducción en el número de macrófagos tisulares que se observa en los ratones deficientes para el receptor de M-CSF (Dai et al., 2002), pone de manifiesto el papel fundamental de M-CSF en el mantenimiento de la homeostasis de los macrófagos *in vivo*. Además, en situación de reposo, se ha descrito que los macrófagos CX3CR1⁺ de la lámina propia derivan de monocitos Ly6C^{hi} y que el proceso de diferenciación es dependiente de M-CSF (Bogunovic et al., 2009); (Varol et al., 2009). Sin embargo, los trabajos han abordado el estudio de la implicación de distintas citoquinas en la diferenciación de macrófagos en situación de inflamación o infección, son muy escasos. En situación de inflamación, en un modelo de peritonitis y de inflamación pulmonar, el tratamiento con anticuerpos contra M-CSF o GM-CSF, se ha observado que en ambos casos, conduce a una reducción en el número de macrófagos inflamatorios (Lenzo et al., 2012). En contraste con este último trabajo, nuestro análisis de las distintas poblaciones de macrófagos presentes en ratones GM-CSFR KO durante infección con *L. major*, sugirieron que la señalización a través de esta vía no es necesaria en generación y/o mantenimiento de dichas subpoblaciones de macrófagos. Por tanto, el estudio de la implicación de otras citoquinas o factores que median en dicho proceso continúa por ser esclarecido.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio han dado lugar a las siguientes conclusiones:

1. En el modelo de infección con *Leishmania major* se produce un fuerte incremento en el número de monocitos reclutados tanto a la dermis como al PO-LN drenante, al igual que se produce un notable aumento de las dDCs de la dermis y las moDCs del PO-LN en ratones resistentes a la infección.
2. El proceso de diferenciación de monocitos a DCs en la dermis es substancialmente más rápido que el de monocitos a DCs en el PO-LN en base a los experimentos de transferencia de monocitos, y puede estar determinado por el entorno inflamatorio de cada una de las localizaciones.
3. En los ratones deficientes para el receptor CCR2, se observó una fuerte reducción en el número de monocitos y dDCs presentes en la dermis, así como en el número de monocitos y moDCs del PO-LN, que indica que la mayoría de dDCs de la dermis y de moDCs del PO-LN derivan de monocitos que se diferencian localmente.
4. La proporción relativa dDC/monocito en la dermis de los ratones deficientes para CCR2 es significativamente menor en comparación con la observada en los ratones C57BL/6, y está correlacionado con el mayor grado de infección que presentan en esta localización.
5. Las dDCs presentes en los PO-LN provienen de dDCs diferenciadas a partir de monocitos en la dermis que migran a través de los vasos linfáticos hasta el PO-LN.
6. Nuestros datos indican que la diferenciación de las dDCs en la dermis y de las moDCs en el PO-LN, no es dependiente de las citoquinas GM-CSF, M-CSF o Flt3L durante la infección con *Leishmania major*.
7. La diferenciación de los macrófagos en el PO-LN durante infección por *Leishmania major* no depende del reclutamiento de monocitos.

BIBLIOGRAFÍA

Ajami, B., Bennett, J.L., Krieger, C., McNagny, K.M., and Rossi, F.M. (2011). Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nat Neurosci* 14, 1142-1149.

Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404, 193-197.

Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.

Albert, M.L., Pearce, S.F., Francisco, L.M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R.L., and Bhardwaj, N. (1998). Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 188, 1359-1368.

Aldridge, J.R., Jr., Moseley, C.E., Boltz, D.A., Negovetich, N.J., Reynolds, C., Franks, J., Brown, S.A., Doherty, P.C., Webster, R.G., and Thomas, P.G. (2009). TNF/iNOS-producing dendritic cells are the necessary evil of lethal influenza virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 5306-5311.

Allan, R.S., Smith, C.M., Belz, G.T., van Lint, A.L., Wakim, L.M., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2003). Epidermal viral immunity induced by CD8alpha+ dendritic cells but not by Langerhans cells. *Science* 301, 1925-1928.

Allan, R.S., Waithman, J., Bedoui, S., Jones, C.M., Villadangos, J.A., Zhan, Y., Lew, A.M., Shortman, K., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2006). Migratory dendritic cells transfer antigen to a lymph node-resident dendritic cell population for efficient CTL priming. *Immunity* 25, 153-162.

Allenspach, E.J., Lemos, M.P., Porrett, P.M., Turka, L.A., and Laufer, T.M. (2008). Migratory and lymphoid-resident dendritic cells cooperate to efficiently prime naive CD4 T cells. *Immunity* 29, 795-806.

Arnold, L., Henry, A., Poron, F., Baba-Amer, Y., van Rooijen, N., Plonquet, A., Gherardi, R.K., and Chazaud, B. (2007). Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med* 204, 1057-1069.

Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cumano, A., Lauvau, G., and Geissmann, F. (2007). Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 317, 666-670.

Auffray, C., Fogg, D.K., Narni-Mancinelli, E., Senechal, B., Trouillet, C., Saederup, N., Leemput, J., Bigot, K., Campisi, L., Abitbol, M., *et al.* (2009a). CX3CR1+ CD115+ CD135+ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. *J Exp Med* 206, 595-606.

Auffray, C., Sieweke, M.H., and Geissmann, F. (2009b). Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 27, 669-692.

Banchereau, J., and Pascual, V. (2006). Type I interferon in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Immunity* 25, 383-392.

Bedoui, S., Whitney, P.G., Waithman, J., Eidsmo, L., Wakim, L., Caminschi, I., Allan, R.S., Wojtasiak, M., Shortman, K., Carbone, F.R., *et al.* (2009). Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103⁺ dendritic cells. *Nat Immunol* 10, 488-495.

Belkaid, Y., Mendez, S., Lira, R., Kadambi, N., Milon, G., and Sacks, D. (2000). A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *J Immunol* 165, 969-977.

Belkaid, Y., Von Stebut, E., Mendez, S., Lira, R., Caler, E., Bertholet, S., Udey, M.C., and Sacks, D. (2002). CD8⁺ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J Immunol* 168, 3992-4000.

Belz, G.T., Behrens, G.M., Smith, C.M., Miller, J.F., Jones, C., Lejon, K., Fathman, C.G., Mueller, S.N., Shortman, K., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (2002). The CD8 α (⁺) dendritic cell is responsible for inducing peripheral self-tolerance to tissue-associated antigens. *J Exp Med* 196, 1099-1104.

Belz, G.T., Shortman, K., Bevan, M.J., and Heath, W.R. (2005). CD8 α (⁺) dendritic cells selectively present MHC class I-restricted noncytolytic viral and intracellular bacterial antigens in vivo. *J Immunol* 175, 196-200.

Belz, G.T., Smith, C.M., Eichner, D., Shortman, K., Karupiah, G., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (2004a). Cutting edge: conventional CD8 α (⁺) dendritic cells are generally involved in priming CTL immunity to viruses. *J Immunol* 172, 1996-2000.

Belz, G.T., Smith, C.M., Kleinert, L., Reading, P., Brooks, A., Shortman, K., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (2004b). Distinct migrating and nonmigrating dendritic cell populations are involved in MHC class I-restricted antigen presentation after lung infection with virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8670-8675.

Biron, C.A. (2001). Interferons alpha and beta as immune regulators--a new look. *Immunity* 14, 661-664.

Bogunovic, M., Ginhoux, F., Helft, J., Shang, L., Hashimoto, D., Greter, M., Liu, K., Jakubzick, C., Ingersoll, M.A., Leboeuf, M., *et al.* (2009). Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity* 31, 513-525.

Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M.C., and Steinman, R.M. (2002). Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8⁺ T cell tolerance. *J Exp Med* 196, 1627-1638.

Bosschaerts, T., Guillems, M., Stijlemans, B., Morias, Y., Engel, D., Tacke, F., Herin, M., De Baetselier, P., and Beschin, A. (2010). Tip-DC development during parasitic infection is regulated by IL-10 and requires CCL2/CCR2, IFN- γ and MyD88 signaling. *PLoS Pathog* 6, e1001045.

Brewig, N., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Veit, A., Bickert, T., Fleischer, B., Mostbock, S., and Ritter, U. (2009). Priming of CD8⁺ and CD4⁺ T cells in experimental leishmaniasis is initiated by different dendritic cell subtypes. *J Immunol* 182, 774-783.

Burgess, A.W., and Metcalf, D. (1980). The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Blood* 56, 947-958.

Bursch, L.S., Wang, L., Igyarto, B., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Kaplan, D.H., and Hogquist, K.A. (2007). Identification of a novel population of Langerin⁺ dendritic cells. *J Exp Med* 204, 3147-3156.

Campbell, I.K., van Nieuwenhuijze, A., Segura, E., O'Donnell, K., Coghill, E., Hommel, M., Gerondakis, S., Villadangos, J.A., and Wicks, I.P. (2011). Differentiation of inflammatory dendritic cells is mediated by NF-kappaB1-dependent GM-CSF production in CD4 T cells. *J Immunol* 186, 5468-5477.

Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Dezutter-Dambuyant, C., de Saint-Vis, B., Jacquet, C., Yoneda, K., Imamura, S., Schmitt, D., and Banchereau, J. (1996). CD34⁺ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J Exp Med* 184, 695-706.

Cecchini, M.G., Dominguez, M.G., Mocci, S., Wetterwald, A., Felix, R., Fleisch, H., Chisholm, O., Hofstetter, W., Pollard, J.W., and Stanley, E.R. (1994). Role of colony stimulating factor-1 in the establishment and regulation of tissue macrophages during postnatal development of the mouse. *Development* 120, 1357-1372.

Charmoy, M., Brunner-Agten, S., Aebischer, D., Auderset, F., Launois, P., Milon, G., Proudfoot, A.E., and Tacchini-Cottier, F. (2010). Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of *Leishmania major* inoculation in resistant mice. *PLoS Pathog* 6, e1000755.

Chitu, V., and Stanley, E.R. (2006). Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation. *Curr Opin Immunol* 18, 39-48.

Chorro, L., Sarde, A., Li, M., Woollard, K.J., Chambon, P., Malissen, B., Kissenpfennig, A., Barbaroux, J.B., Groves, R., and Geissmann, F. (2009). Langerhans cell (LC) proliferation mediates neonatal development, homeostasis, and inflammation-associated expansion of the epidermal LC network. *J Exp Med* 206, 3089-3100.

Colonna, M., Trinchieri, G., and Liu, Y.J. (2004). Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 5, 1219-1226.

Combadiere, C., Poteaux, S., Rodero, M., Simon, T., Pezard, A., Esposito, B., Merval, R., Proudfoot, A., Tedgui, A., and Mallat, Z. (2008). Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytosis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation* 117, 1649-1657.

Cook, A.D., Turner, A.L., Braine, E.L., Pobjoy, J., Lenzo, J.C., and Hamilton, J.A. (2011). Regulation of systemic and local myeloid cell subpopulations by bone marrow cell-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in experimental inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 63, 2340-2351.

Copin, R., De Baetselier, P., Carlier, Y., Letesson, J.J., and Muraille, E. (2007). MyD88-dependent activation of B220-CD11b⁺LY-6C⁺ dendritic cells during *Brucella melitensis* infection. *J Immunol* 178, 5182-5191.

Crane, M.J., Hokeness-Antonelli, K.L., and Salazar-Mather, T.P. (2009). Regulation of inflammatory monocyte/macrophage recruitment from the bone marrow during murine cytomegalovirus infection: role for type I interferons in localized induction of CCR2 ligands. *J Immunol* 183, 2810-2817.

Crozat, K., Guiton, R., Contreras, V., Feuillet, V., Dutertre, C.A., Ventre, E., Vu Manh, T.P., Baranek, T., Storset, A.K., Marvel, J., *et al.* (2010). The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8alpha⁺ dendritic cells. *J Exp Med* 207, 1283-1292.

D'Amico, A., and Wu, L. (2003). The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3. *J Exp Med* 198, 293-303.

Dai, X.M., Ryan, G.R., Hapel, A.J., Dominguez, M.G., Russell, R.G., Kapp, S., Sylvestre, V., and Stanley, E.R. (2002). Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood* 99, 111-120.

Dakic, A., Shao, Q.X., D'Amico, A., O'Keeffe, M., Chen, W.F., Shortman, K., and Wu, L. (2004). Development of the dendritic cell system during mouse ontogeny. *J Immunol* 172, 1018-1027.

Davies, L.C., Rosas, M., Smith, P.J., Fraser, D.J., Jones, S.A., and Taylor, P.R. (2011). A quantifiable proliferative burst of tissue macrophages restores homeostatic macrophage populations after acute inflammation. *Eur J Immunol* 41, 2155-2164.

De Trez, C., Magez, S., Akira, S., Ryffel, B., Carlier, Y., and Muraille, E. (2009). iNOS-producing inflammatory dendritic cells constitute the major infected cell type during the chronic *Leishmania* major infection phase of C57BL/6 resistant mice. *PLoS Pathog* 6, 1-13.

den Haan, J.M., Lehar, S.M., and Bevan, M.J. (2000). CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med* 192, 1685-1696.

Deng, L., Dai, P., Ding, W., Granstein, R.D., and Shuman, S. (2006). Vaccinia virus infection attenuates innate immune responses and antigen presentation by epidermal dendritic cells. *J Virol* 80, 9977-9987.

Dominguez, P.M., and Ardavin, C. (2010). Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation. *Immunol Rev* 234, 90-104.

Drevets, D.A., Schawang, J.E., Mandava, V.K., Dillon, M.J., and Leenen, P.J. (2010). Severe *Listeria monocytogenes* infection induces development of monocytes with distinct phenotypic and functional features. *J Immunol* 185, 2432-2441.

Dudziak, D., Kamphorst, A.O., Heidkamp, G.F., Buchholz, V.R., Trumpfheller, C., Yamazaki, S., Cheong, C., Liu, K., Lee, H.W., Park, C.G., *et al.* (2007). Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* 315, 107-111.

Dunay, I.R., Damatta, R.A., Fux, B., Presti, R., Greco, S., Colonna, M., and Sibley, L.D. (2008). Gr1(+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*. *Immunity* 29, 306-317.

Dunay, I.R., Fuchs, A., and Sibley, L.D. (2010). Inflammatory monocytes but not neutrophils are necessary to control infection with *Toxoplasma gondii* in mice. *Infect Immun* 78, 1564-1570.

Edelson, B.T., Bradstreet, T.R., Hildner, K., Carrero, J.A., Frederick, K.E., Kc, W., Belizaire, R., Aoshi, T., Schreiber, R.D., Miller, M.J., *et al.* (2011). CD8alpha(+) dendritic cells are an obligate cellular entry point for productive infection by *Listeria monocytogenes*. *Immunity* 35, 236-248.

Edelson, B.T., Kc, W., Juang, R., Kohyama, M., Benoit, L.A., Klekotka, P.A., Moon, C., Albring, J.C., Ise, W., Michael, D.G., *et al.* (2010). Peripheral CD103⁺ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8alpha⁺ conventional dendritic cells. *J Exp Med* 207, 823-836.

Eidsmo, L., Allan, R., Caminschi, I., van Rooijen, N., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2009). Differential migration of epidermal and dermal dendritic cells during skin infection. *J Immunol* 182, 3165-3172.

Filippi, C., Hugues, S., Cazareth, J., Julia, V., Glaichenhaus, N., and Ugolini, S. (2003). CD4⁺ T cell polarization in mice is modulated by strain-specific major histocompatibility complex-independent differences within dendritic cells. *J Exp Med* 198, 201-209.

Fleetwood, A.J., Cook, A.D., and Hamilton, J.A. (2005). Functions of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Crit Rev Immunol* 25, 405-428.

Fleetwood, A.J., Lawrence, T., Hamilton, J.A., and Cook, A.D. (2007). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *J Immunol* 178, 5245-5252.

Fogg, D.K., Sibon, C., Miled, C., Jung, S., Aucouturier, P., Littman, D.R., Cumano, A., and Geissmann, F. (2006). A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* 311, 83-87.

Forster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Muller, I., Wolf, E., and Lipp, M. (1999). CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99, 23-33.

Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., and Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327, 656-661.

Getts, D.R., Terry, R.L., Getts, M.T., Muller, M., Rana, S., Shrestha, B., Radford, J., Van Rooijen, N., Campbell, I.L., and King, N.J. (2008). Ly6c⁺ "inflammatory monocytes" are microglial precursors recruited in a pathogenic manner in West Nile virus encephalitis. *J Exp Med* 205, 2319-2337.

Gilliet, M., and Lande, R. (2008). Antimicrobial peptides and self-DNA in autoimmune skin inflammation. *Curr Opin Immunol* 20, 401-407.

Ginhoux, F., Collin, M.P., Bogunovic, M., Abel, M., Leboeuf, M., Helft, J., Ochando, J., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Grisotto, M., *et al.* (2007). Blood-derived dermal langerin⁺ dendritic cells survey the skin in the steady state. *J Exp Med* 204, 3133-3146.

Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., *et al.* (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330, 841-845.

Ginhoux, F., Liu, K., Helft, J., Bogunovic, M., Greter, M., Hashimoto, D., Price, J., Yin, N., Bromberg, J., Lira, S.A., *et al.* (2009). The origin and development of nonlymphoid tissue CD103⁺ DCs. *J Exp Med* 206, 3115-3130.

Ginhoux, F., Tacke, F., Angeli, V., Bogunovic, M., Loubéau, M., Dai, X.M., Stanley, E.R., Randolph, G.J., and Merad, M. (2006). Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat Immunol* 7, 265-273.

Goncalves, R., Zhang, X., Cohen, H., Debrabant, A., and Mosser, D.M. (2011). Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania major* infection. *J Exp Med* 208, 1253-1265.

Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5, 953-964.

Gray, E.E., and Cyster, J.G. (2012). Lymph node macrophages. *J Innate Immun* 4, 424-436.

Gregorio, J., Meller, S., Conrad, C., Di Nardo, A., Homey, B., Lauerma, A., Arai, N., Gallo, R.L., Digiovanni, J., and Gilliet, M. (2010). Plasmacytoid dendritic cells sense skin injury and promote wound healing through type I interferons. *J Exp Med* 207, 2921-2930.

Greter, M., Helft, J., Chow, A., Hashimoto, D., Mortha, A., Agudo-Cantero, J., Bogunovic, M., Gautier, E.L., Miller, J., Leboeuf, M., *et al.* (2012a). GM-CSF controls nonlymphoid tissue dendritic cell homeostasis but is dispensable for the differentiation of inflammatory dendritic cells. *Immunity* 36, 1031-1046.

Greter, M., Lelios, I., Pelczar, P., Hoeffel, G., Price, J., Leboeuf, M., Kundig, T.M., Frei, K., Ginhoux, F., Merad, M., and Becher, B. (2012b). Stroma-derived interleukin-34 controls the development and maintenance of langerhans cells and the maintenance of microglia. *Immunity* 37, 1050-1060.

Guiducci, C., Ghirelli, C., Marloie-Provost, M.A., Matray, T., Coffman, R.L., Liu, Y.J., Barrat, F.J., and Soumelis, V. (2008). PI3K is critical for the nuclear translocation of IRF-7 and type I IFN production by human plasmacytoid dendritic cells in response to TLR activation. *J Exp Med* 205, 315-322.

Guilliams, M., Movahedi, K., Bosschaerts, T., VandenDriessche, T., Chuah, M.K., Herin, M., Acosta-Sanchez, A., Ma, L., Moser, M., Van Ginderachter, J.A., *et al.* (2009). IL-10 dampens TNF/inducible nitric oxide synthase-producing dendritic cell-mediated pathogenicity during parasitic infection. *J Immunol* 182, 1107-1118.

Hamilton, J.A. (2008). Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 8, 533-544.

Hamilton, J.A., Stanley, E.R., Burgess, A.W., and Shadduck, R.K. (1980). Stimulation of macrophage plasminogen activator activity by colony-stimulating factors. *J Cell Physiol* 103, 435-445.

Hanna, R.N., Carlin, L.M., Hubbeling, H.G., Nackiewicz, D., Green, A.M., Punt, J.A., Geissmann, F., and Hedrick, C.C. (2011). The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C⁺ monocytes. *Nat Immunol* 12, 778-785.

Hashimoto, D., Miller, J., and Merad, M. (2011). Dendritic cell and macrophage heterogeneity in vivo. *Immunity* 35, 323-335.

Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., Ravetch, J.V., Steinman, R.M., and Nussenzweig, M.C. (2001). Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* 194, 769-779.

Helft, J., Ginhoux, F., Bogunovic, M., and Merad, M. (2010). Origin and functional heterogeneity of non-lymphoid tissue dendritic cells in mice. *Immunol Rev* 234, 55-75.

Henri, S., Poulin, L.F., Tamoutounour, S., Ardouin, L., Guilliams, M., de Bovis, B., Devilard, E., Viret, C., Azukizawa, H., Kissenpfennig, A., and Malissen, B. (2010). CD207+ CD103+ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells. *J Exp Med* 207, 189-206.

Henri, S., Vremec, D., Kamath, A., Waithman, J., Williams, S., Benoist, C., Burnham, K., Saeland, S., Handman, E., and Shortman, K. (2001). The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. *J Immunol* 167, 741-748.

Hildner, K., Edelson, B.T., Purtha, W.E., Diamond, M., Matsushita, H., Kohyama, M., Calderon, B., Schraml, B.U., Unanue, E.R., Diamond, M.S., *et al.* (2008). Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* 322, 1097-1100.

Hill, S., Edwards, A.J., Kimber, I., and Knight, S.C. (1990). Systemic migration of dendritic cells during contact sensitization. *Immunology* 71, 277-281.

Hohl, T.M., Rivera, A., Lipuma, L., Gallegos, A., Shi, C., Mack, M., and Pamer, E.G. (2009). Inflammatory monocytes facilitate adaptive CD4 T cell responses during respiratory fungal infection. *Cell Host Microbe* 6, 470-481.

Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S., and Steinman, R.M. (1992). Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 176, 1693-1702.

Iyoda, T., Shimoyama, S., Liu, K., Omatsu, Y., Akiyama, Y., Maeda, Y., Takahara, K., Steinman, R.M., and Inaba, K. (2002). The CD8+ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J Exp Med* 195, 1289-1302.

Jakubzick, C., Tacke, F., Ginhoux, F., Wagers, A.J., van Rooijen, N., Mack, M., Merad, M., and Randolph, G.J. (2008). Blood monocyte subsets differentially give rise to CD103+ and CD103-pulmonary dendritic cell populations. *J Immunol* 180, 3019-3027.

Jego, G., Palucka, A.K., Blanck, J.P., Chalouni, C., Pascual, V., and Banchereau, J. (2003). Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* 19, 225-234.

Jenkins, S.J., Ruckerl, D., Cook, P.C., Jones, L.H., Finkelman, F.D., van Rooijen, N., MacDonald, A.S., and Allen, J.E. (2011). Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science* 332, 1284-1288.

Karsunky, H., Merad, M., Cozzio, A., Weissman, I.L., and Manz, M.G. (2003). Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 198, 305-313.

Kautz-Neu, K., Noordegraaf, M., Dinges, S., Bennett, C.L., John, D., Clausen, B.E., and von Stebut, E. (2011). Langerhans cells are negative regulators of the anti-Leishmania response. *J Exp Med* 208, 885-891.

Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11, 373-384.

Kenins, L., Gill, J.W., Boyd, R.L., Hollander, G.A., and Wodnar-Filipowicz, A. (2008). Intrathymic expression of Flt3 ligand enhances thymic recovery after irradiation. *J Exp Med* 205, 523-531.

Killick-Kendrick, R. (1990). Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol* 4, 1-24.

Kim, Y.G., Kamada, N., Shaw, M.H., Warner, N., Chen, G.Y., Franchi, L., and Nunez, G. (2011). The Nod2 sensor promotes intestinal pathogen eradication via the chemokine CCL2-dependent recruitment of inflammatory monocytes. *Immunity* 34, 769-780.

King, I.L., Dickendesh, T.L., and Segal, B.M. (2009). Circulating Ly-6C⁺ myeloid precursors migrate to the CNS and play a pathogenic role during autoimmune demyelinating disease. *Blood* 113, 3190-3197.

King, I.L., Kroenke, M.A., and Segal, B.M. (2010). GM-CSF-dependent, CD103⁺ dermal dendritic cells play a critical role in Th effector cell differentiation after subcutaneous immunization. *J Exp Med* 207, 953-961.

Kingston, D., Schmid, M.A., Onai, N., Obata-Onai, A., Baumjohann, D., and Manz, M.G. (2009). The concerted action of GM-CSF and Flt3-ligand on in vivo dendritic cell homeostasis. *Blood* 114, 835-843.

Kondo, M., Scherer, D.C., King, A.G., Manz, M.G., and Weissman, I.L. (2001). Lymphocyte development from hematopoietic stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 11, 520-526.

Korner, U., Fuss, V., Steigerwald, J., and Moll, H. (2006). Biogenesis of Leishmania major-harboring vacuoles in murine dendritic cells. *Infect Immun* 74, 1305-1312.

Landsman, L., and Jung, S. (2007). Lung macrophages serve as obligatory intermediate between blood monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol* 179, 3488-3494.

Landsman, L., Varol, C., and Jung, S. (2007). Distinct differentiation potential of blood monocyte subsets in the lung. *J Immunol* 178, 2000-2007.

Laskay, T., van Zandbergen, G., and Solbach, W. (2003). Neutrophil granulocytes--Trojan horses for Leishmania major and other intracellular microbes? *Trends Microbiol* 11, 210-214.

Le Bon, A., Etchart, N., Rossmann, C., Ashton, M., Hou, S., Gewert, D., Borrow, P., and Tough, D.F. (2003). Cross-priming of CD8⁺ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat Immunol* 4, 1009-1015.

Lenzo, J.C., Turner, A.L., Cook, A.D., Vlahos, R., Anderson, G.P., Reynolds, E.C., and Hamilton, J.A. (2012). Control of macrophage lineage populations by CSF-1 receptor and GM-CSF in homeostasis and inflammation. *Immunol Cell Biol* 90, 429-440.

Leon, B., and Ardavin, C. (2008a). Monocyte migration to inflamed skin and lymph nodes is differentially controlled by L-selectin and PSGL-1. *Blood* 111, 3126-3130.

Leon, B., and Ardavin, C. (2008b). Monocyte-derived dendritic cells in innate and adaptive immunity. *Immunol Cell Biol* 86, 320-324.

Leon, B., Lopez-Bravo, M., and Ardavin, C. (2007). Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity* 26, 519-531.

Lin, H., Lee, E., Hestir, K., Leo, C., Huang, M., Bosch, E., Halenbeck, R., Wu, G., Zhou, A., Behrens, D., *et al.* (2008). Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. *Science* 320, 807-811.

Liu, K., Vitoria, G.D., Schwickert, T.A., Guernonprez, P., Meredith, M.M., Yao, K., Chu, F.F., Randolph, G.J., Rudensky, A.Y., and Nussenzweig, M. (2009). In Vivo Analysis of Dendritic Cell Development and Homeostasis. *Science*.

Liu, K., Waskow, C., Liu, X., Yao, K., Hoh, J., and Nussenzweig, M. (2007). Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice. *Nat Immunol* 8, 578-583.

Liu, Y.J. (2005). IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 23, 275-306.

Lopez-Bravo, M., and Ardavin, C. (2008). In vivo induction of immune responses to pathogens by conventional dendritic cells. *Immunity* 29, 343-351.

MacDonald, K.P., Palmer, J.S., Cronau, S., Seppanen, E., Olver, S., Raffelt, N.C., Kuns, R., Pettit, A.R., Clouston, A., Wainwright, B., *et al.* (2010). An antibody against the colony-stimulating factor 1 receptor depletes the resident subset of monocytes and tissue- and tumor-associated macrophages but does not inhibit inflammation. *Blood* 116, 3955-3963.

Malherbe, L., Filippi, C., Julia, V., Foucras, G., Moro, M., Appel, H., Wucherpfennig, K., Guery, J.C., and Glaichenhaus, N. (2000). Selective activation and expansion of high-affinity CD4⁺ T cells in resistant mice upon infection with *Leishmania major*. *Immunity* 13, 771-782.

Manz, M.G., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I.L., and Akashi, K. (2001). Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* 97, 3333-3341.

Martinez-Moczygemba, M., and Huston, D.P. (2003). Biology of common beta receptor-signaling cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF. *J Allergy Clin Immunol* 112, 653-665; quiz 666.

Mashayekhi, M., Sandau, M.M., Dunay, I.R., Frickel, E.M., Khan, A., Goldszmid, R.S., Sher, A., Ploegh, H.L., Murphy, T.L., Sibley, L.D., and Murphy, K.M. (2011). CD8alpha(+) dendritic cells are the critical source of interleukin-12 that controls acute infection by *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Immunity* 35, 249-259.

McKenna, H.J., Stocking, K.L., Miller, R.E., Brasel, K., De Smedt, T., Maraskovsky, E., Maliszewski, C.R., Lynch, D.H., Smith, J., Pulendran, B., *et al.* (2000). Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* 95, 3489-3497.

McLachlan, J.B., Catron, D.M., Moon, J.J., and Jenkins, M.K. (2009). Dendritic cell antigen presentation drives simultaneous cytokine production by effector and regulatory T cells in inflamed skin. *Immunity* 30, 277-288.

Merad, M., Ginhoux, F., and Collin, M. (2008). Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 8, 935-947.

Merad, M., Manz, M.G., Karsunky, H., Wagers, A., Peters, W., Charo, I., Weissman, I.L., Cyster, J.G., and Engleman, E.G. (2002). Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol* 3, 1135-1141.

Metcalf, D. (1986). The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Blood* 67, 257-267.

Mildner, A., Schmidt, H., Nitsche, M., Merkler, D., Hanisch, U.K., Mack, M., Heikenwalder, M., Bruck, W., Priller, J., and Prinz, M. (2007). Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci* 10, 1544-1553.

Miles, S.A., Conrad, S.M., Alves, R.G., Jeronimo, S.M., and Mosser, D.M. (2005). A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *J Exp Med* 201, 747-754.

Mosser, D.M., and Edelson, P.J. (1985). The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. *J Immunol* 135, 2785-2789.

Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8, 958-969.

Mougneau, E., Bihl, F., and Glaichenhaus, N. (2011). Cell biology and immunology of *Leishmania*. *Immunol Rev* 240, 286-296.

Murray, H.W., Berman, J.D., Davies, C.R., and Saravia, N.G. (2005). Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366, 1561-1577.

Murray, P.J., and Wynn, T.A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 11, 723-737.

Nahrendorf, M., Pittet, M.J., and Swirski, F.K. (2010). Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation* 121, 2437-2445.

Nahrendorf, M., Swirski, F.K., Aikawa, E., Stangenberg, L., Wurdinger, T., Figueiredo, J.L., Libby, P., Weissleder, R., and Pittet, M.J. (2007). The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* 204, 3037-3047.

Naik, S.H., Metcalf, D., van Nieuwenhuijze, A., Wicks, I., Wu, L., O'Keeffe, M., and Shortman, K. (2006). Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat Immunol* 7, 663-671.

Naik, S.H., Sathe, P., Park, H.Y., Metcalf, D., Proietto, A.I., Dakic, A., Carotta, S., O'Keeffe, M., Bahlo, M., Papenfuss, A., *et al.* (2007). Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat Immunol* 8, 1217-1226.

Ng, L.G., Hsu, A., Mandell, M.A., Roediger, B., Hoeller, C., Mrass, P., Iparraguirre, A., Cavanagh, L.L., Triccas, J.A., Beverley, S.M., *et al.* (2008). Migratory dermal dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites. *PLoS Pathog* 4, e1000222.

Nishinakamura, R., Nakayama, N., Hirabayashi, Y., Inoue, T., Aud, D., McNeil, T., Azuma, S., Yoshida, S., Toyoda, Y., Arai, K., and *et al.* (1995). Mice deficient for the IL-3/GM-CSF/IL-5 beta c receptor exhibit lung pathology and impaired immune response, while beta IL3 receptor-deficient mice are normal. *Immunity* 2, 211-222.

Ohl, L., Mohaupt, M., Czeloth, N., Hintzen, G., Kiafard, Z., Zwirner, J., Blankenstein, T., Henning, G., and Forster, R. (2004). CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity* 21, 279-288.

Onai, N., Obata-Onai, A., Schmid, M.A., Ohteki, T., Jarrossay, D., and Manz, M.G. (2007). Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat Immunol* 8, 1207-1216.

Osterholzer, J.J., Chen, G.H., Olszewski, M.A., Curtis, J.L., Huffnagle, G.B., and Toews, G.B. (2009). Accumulation of CD11b+ lung dendritic cells in response to fungal infection results from the CCR2-mediated recruitment and differentiation of Ly-6Chigh monocytes. *J Immunol* 183, 8044-8053.

Pestka, S., Krause, C.D., and Walter, M.R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 202, 8-32.

Peters, N.C., Egen, J.G., Secundino, N., Debrabant, A., Kimblin, N., Kamhawi, S., Lawyer, P., Fay, M.P., Germain, R.N., and Sacks, D. (2008). In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 321, 970-974.

Peters, W., Cyster, J.G., Mack, M., Schlondorff, D., Wolf, A.J., Ernst, J.D., and Charo, I.F. (2004). CCR2-dependent trafficking of F4/80dim macrophages and CD11cdim/intermediate dendritic cells is crucial for T cell recruitment to lungs infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 172, 7647-7653.

Pixley, F.J., and Stanley, E.R. (2004). CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends Cell Biol* 14, 628-638.

Pollard, J.W. (2009). Trophic macrophages in development and disease. *Nat Rev Immunol* 9, 259-270.

Pooley, J.L., Heath, W.R., and Shortman, K. (2001). Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells. *J Immunol* 166, 5327-5330.

Poulin, L.F., Henri, S., de Bovis, B., Devilard, E., Kissenpfennig, A., and Malissen, B. (2007). The dermis contains langerin+ dendritic cells that develop and function independently of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 204, 3119-3131.

Probst, H.C., McCoy, K., Okazaki, T., Honjo, T., and van den Broek, M. (2005). Resting dendritic cells induce peripheral CD8⁺ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nat Immunol* 6, 280-286.

Randolph, G.J., Angeli, V., and Swartz, M.A. (2005). Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol* 5, 617-628.

Randolph, G.J., Inaba, K., Robbani, D.F., Steinman, R.M., and Muller, W.A. (1999). Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* 11, 753-761.

Randolph, G.J., Ochoa, J., and Partida-Sanchez, S. (2008). Migration of dendritic cell subsets and their precursors. *Annu Rev Immunol* 26, 293-316.

Ravichandran, K.S., and Lorenz, U. (2007). Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nat Rev Immunol* 7, 964-974.

Reis e Sousa, C. (2006). Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* 6, 476-483.

Ribeiro-Gomes, F.L., Peters, N.C., Debrabant, A., and Sacks, D.L. (2012). Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response. *PLoS Pathog* 8, e1002536.

Ritter, U., Meissner, A., Scheidig, C., and Korner, H. (2004). CD8 alpha- and Langerin-negative dendritic cells, but not Langerhans cells, act as principal antigen-presenting cells in leishmaniasis. *Eur J Immunol* 34, 1542-1550.

Rivera, A., Hohl, T.M., Collins, N., Leiner, I., Gallegos, A., Saijo, S., Coward, J.W., Iwakura, Y., and Pamer, E.G. (2011). Dectin-1 diversifies *Aspergillus fumigatus*-specific T cell responses by inhibiting T helper type 1 CD4 T cell differentiation. *J Exp Med* 208, 369-381.

Rivollier, A., He, J., Kole, A., Valatas, V., and Kelsall, B.L. (2012). Inflammation switches the differentiation program of Ly6Chi monocytes from antiinflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon. *J Exp Med* 209, 139-155.

Robb, L., Drinkwater, C.C., Metcalf, D., Li, R., Kontgen, F., Nicola, N.A., and Begley, C.G. (1995). Hematopoietic and lung abnormalities in mice with a null mutation of the common beta subunit of the receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukins 3 and 5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9565-9569.

Sacks, D., and Kamhawi, S. (2001). Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol* 55, 453-483.

Sacks, D., and Noben-Trauth, N. (2002). The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2, 845-858.

Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179, 1109-1118.

Sancho, D., Joffre, O.P., Keller, A.M., Rogers, N.C., Martinez, D., Hernanz-Falcon, P., Rosewell, I., and Reis e Sousa, C. (2009). Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature* 458, 899-903.

Sasmono, R.T., O'Garra, D., Pollard, J.W., Tong, W., Pavli, P., Wainwright, B.J., Ostrowski, M.C., Himes, S.R., and Hume, D.A. (2003). A macrophage colony-stimulating factor receptor-green fluorescent protein transgene is expressed throughout the mononuclear phagocyte system of the mouse. *Blood* 101, 1155-1163.

Sato, N., Ahuja, S.K., Quinones, M., KostECKi, V., Reddick, R.L., Melby, P.C., Kuziel, W.A., and Ahuja, S.S. (2000). CC chemokine receptor (CCR)2 is required for langerhans cell migration and localization of T helper cell type 1 (Th1)-inducing dendritic cells. Absence of CCR2 shifts the *Leishmania* major-resistant phenotype to a susceptible state dominated by Th2 cytokines, b cell outgrowth, and sustained neutrophilic inflammation. *J Exp Med* 192, 205-218.

Schonlau, F., Scharffetter-Kochanek, K., Grabbe, S., Pietz, B., Sorg, C., and Sunderkotter, C. (2000). In experimental leishmaniasis deficiency of CD18 results in parasite dissemination associated with altered macrophage functions and incomplete Th1 cell response. *Eur J Immunol* 30, 2729-2740.

Schulz, C., Gomez Perdiguero, E., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S.E., Pollard, J.W., *et al.* A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* 336, 86-90.

Serbina, N.V., Jia, T., Hohl, T.M., and Pamer, E.G. (2008). Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol* 26, 421-452.

Serbina, N.V., Kuziel, W., Flavell, R., Akira, S., Rollins, B., and Pamer, E.G. (2003a). Sequential MyD88-independent and -dependent activation of innate immune responses to intracellular bacterial infection. *Immunity* 19, 891-901.

Serbina, N.V., and Pamer, E.G. (2006). Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol* 7, 311-317.

Serbina, N.V., Salazar-Mather, T.P., Biron, C.A., Kuziel, W.A., and Pamer, E.G. (2003b). TNF/ iNOS -producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* 19, 59-70.

Shi, C., and Pamer, E.G. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 11, 762-774.

Shortman, K., and Heath, W.R. (2010). The CD8⁺ dendritic cell subset. *Immunol Rev* 234, 18-31.

Skold, M., and Behar, S.M. (2008). Tuberculosis triggers a tissue-dependent program of differentiation and acquisition of effector functions by circulating monocytes. *J Immunol* 181, 6349-6360.

Smith, C.M., Belz, G.T., Wilson, N.S., Villadangos, J.A., Shortman, K., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (2003). Cutting edge: conventional CD8 α^+ dendritic cells are preferentially involved in CTL priming after footpad infection with herpes simplex virus-1. *J Immunol* 170, 4437-4440.

Stanley, E., Lieschke, G.J., Grail, D., Metcalf, D., Hodgson, G., Gall, J.A., Maher, D.W., Cebon, J., Sinickas, V., and Dunn, A.R. (1994). Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5592-5596.

Sunderkotter, C., Nikolic, T., Dillon, M.J., Van Rooijen, N., Stehling, M., Drevets, D.A., and Leenen, P.J. (2004). Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol* 172, 4410-4417.

Sundquist, M., and Wick, M.J. (2009). Salmonella induces death of CD8alpha(+) dendritic cells but not CD11c(int)CD11b(+) inflammatory cells in vivo via MyD88 and TNFR1. *J Leukoc Biol* 85, 225-234.

Swirski, F.K., Libby, P., Aikawa, E., Alcaide, P., Luscinskas, F.W., Weissleder, R., and Pittet, M.J. (2007). Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. *J Clin Invest* 117, 195-205.

Swirski, F.K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., Figueiredo, J.L., Kohler, R.H., Chudnovskiy, A., Waterman, P., *et al.* (2009). Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 325, 612-616.

Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3, 133-146.

Tsou, C.L., Peters, W., Si, Y., Slaymaker, S., Aslanian, A.M., Weisberg, S.P., Mack, M., and Charo, I.F. (2007). Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest* 117, 902-909.

Uzonna, J.E., Joyce, K.L., and Scott, P. (2004). Low dose *Leishmania major* promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon gamma-producing CD8+ T cells. *J Exp Med* 199, 1559-1566.

van de Laar, L., Coffey, P.J., and Woltman, A.M. (2012). Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy. *Blood* 119, 3383-3393.

Varol, C., Landsman, L., Fogg, D.K., Greenshtein, L., Gildor, B., Margalit, R., Kalchenko, V., Geissmann, F., and Jung, S. (2007). Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J Exp Med* 204, 171-180.

Varol, C., Vallon-Eberhard, A., Elinav, E., Aychek, T., Shapira, Y., Luche, H., Fehling, H.J., Hardt, W.D., Shakhar, G., and Jung, S. (2009). Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. *Immunity* 31, 502-512.

Villadangos, J.A., and Schnorrer, P. (2007). Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol* 7, 543-555.

Vremec, D., Lieschke, G.J., Dunn, A.R., Robb, L., Metcalf, D., and Shortman, K. (1997). The influence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell levels in mouse lymphoid organs. *Eur J Immunol* 27, 40-44.

Wang, Y., Szretter, K.J., Vermi, W., Gilfillan, S., Rossini, C., Cella, M., Barrow, A.D., Diamond, M.S., and Colonna, M. (2012). IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nat Immunol* 13, 753-760.

Waskow, C., Liu, K., Darrasse-Jeze, G., Guernonprez, P., Ginhoux, F., Merad, M., Shengelia, T., Yao, K., and Nussenzweig, M. (2008). The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nat Immunol* 9, 676-683.

Watowich, S.S., and Liu, Y.J. (2010). Mechanisms regulating dendritic cell specification and development. *Immunol Rev* 238, 76-92.

Wei, S., Nandi, S., Chitu, V., Yeung, Y.G., Yu, W., Huang, M., Williams, L.T., Lin, H., and Stanley, E.R. (2010). Functional overlap but differential expression of CSF-1 and IL-34 in their CSF-1 receptor-mediated regulation of myeloid cells. *J Leukoc Biol* 88, 495-505.

Wilson, N.S., El-Sukkari, D., Belz, G.T., Smith, C.M., Steptoe, R.J., Heath, W.R., Shortman, K., and Villadangos, J.A. (2003). Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature. *Blood* 102, 2187-2194.

Woelbing, F., Kostka, S.L., Moelle, K., Belkaid, Y., Sunderkoetter, C., Verbeek, S., Waisman, A., Nigg, A.P., Knop, J., Udey, M.C., and von Stebut, E. (2006). Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and facilitates acquisition of protective immunity. *J Exp Med* 203, 177-188.

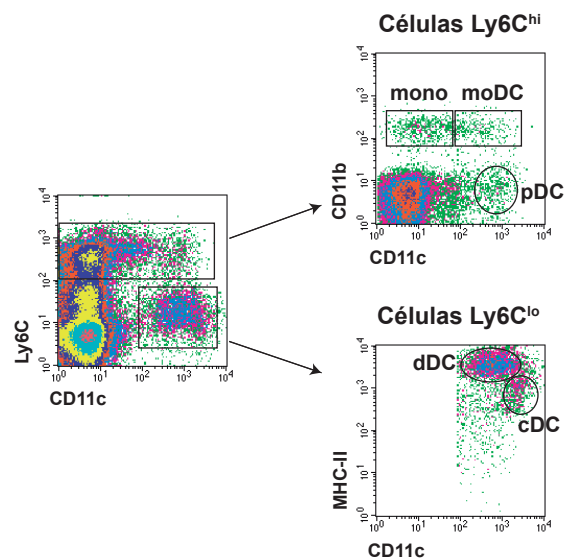
Wu, L., D'Amico, A., Hochrein, H., O'Keeffe, M., Shortman, K., and Lucas, K. (2001). Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors. *Blood* 98, 3376-3382.

Yoneyama, H., Matsuno, K., Zhang, Y., Murai, M., Itakura, M., Ishikawa, S., Hasegawa, G., Naito, M., Asakura, H., and Matsushima, K. (2001). Regulation by chemokines of circulating dendritic cell precursors, and the formation of portal tract-associated lymphoid tissue, in a granulomatous liver disease. *J Exp Med* 193, 35-49.

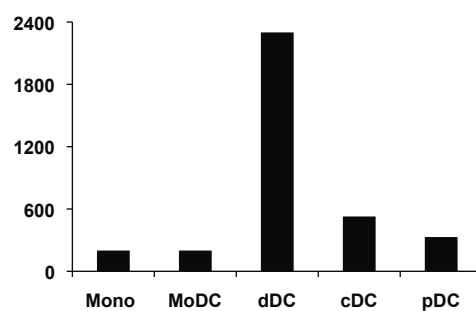
Yoshida, H., Hayashi, S., Kunisada, T., Ogawa, M., Nishikawa, S., Okamura, H., Sudo, T., and Shultz, L.D. (1990). The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 345, 442-444.

Zhan, Y., Xu, Y., and Lew, A.M. (2012). The regulation of the development and function of dendritic cell subsets by GM-CSF: more than a hematopoietic growth factor. *Mol Immunol* 52,

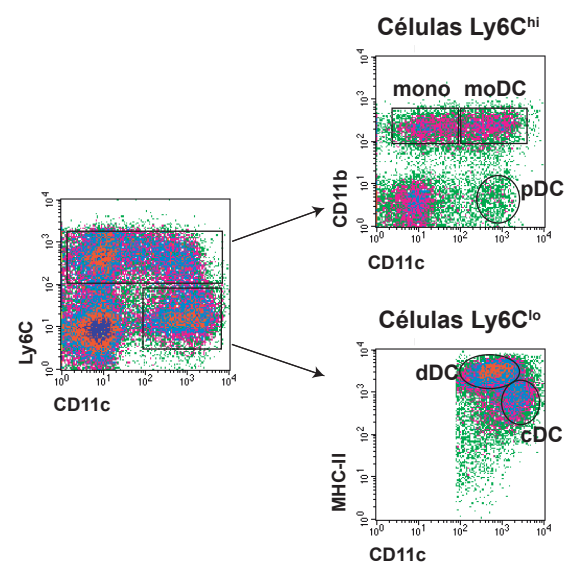
A



Sin Infectar



B



3 semanas post infección

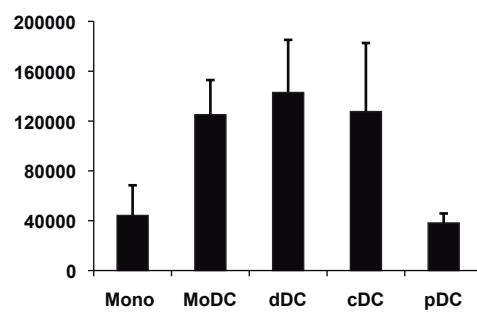
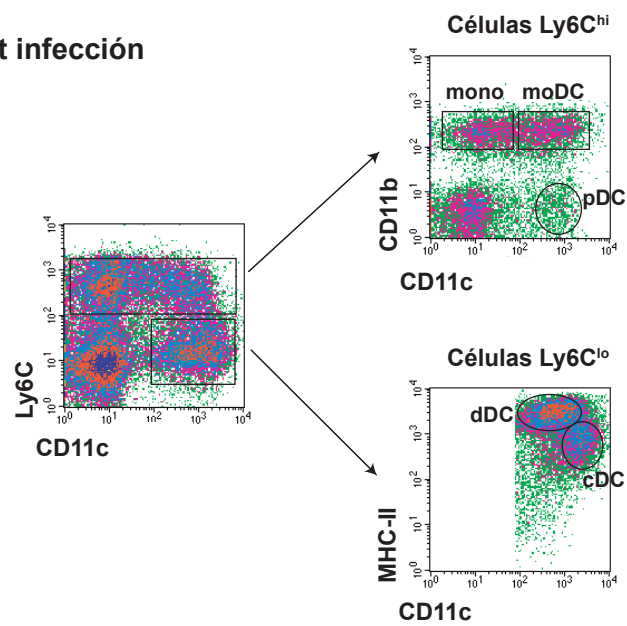


Figura 1

A

3 semanas post infección



B



Figura 2

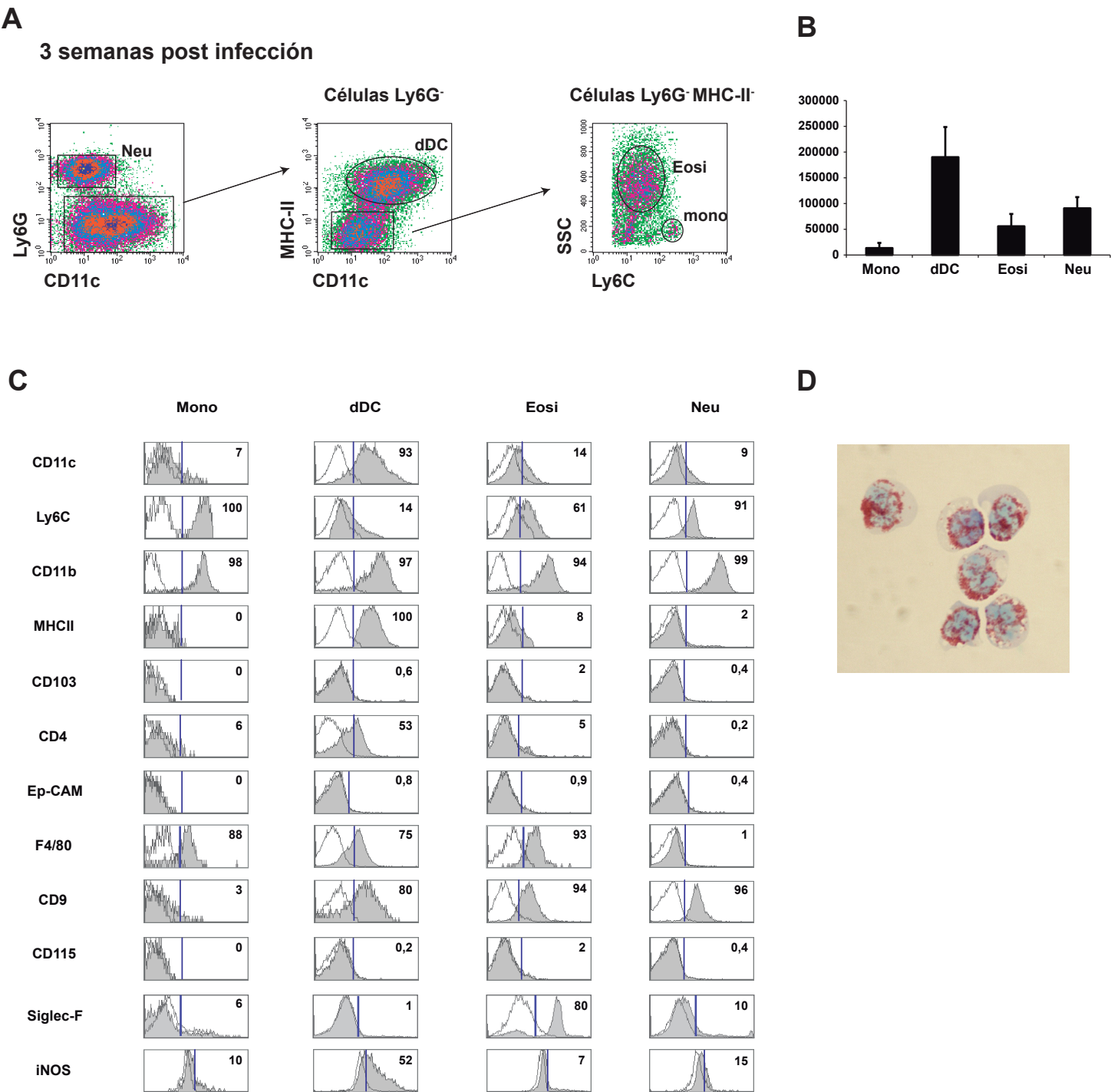


Figura 4

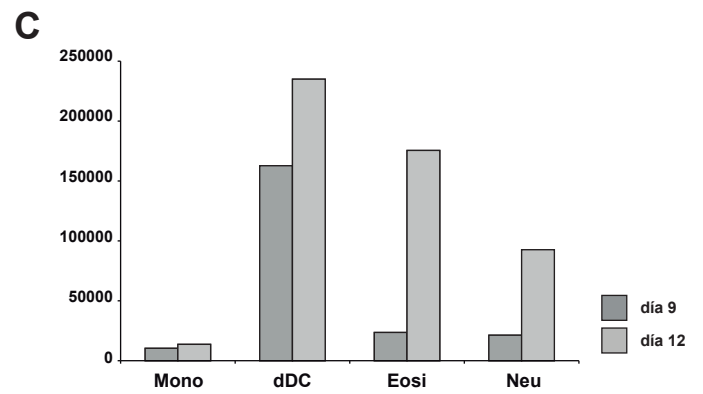
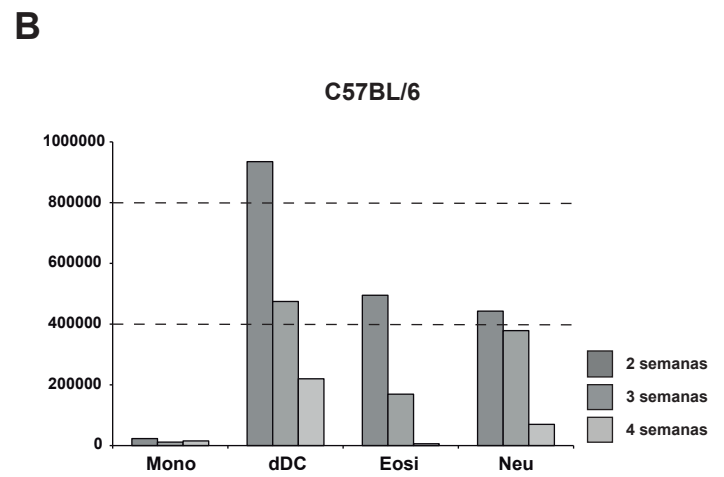
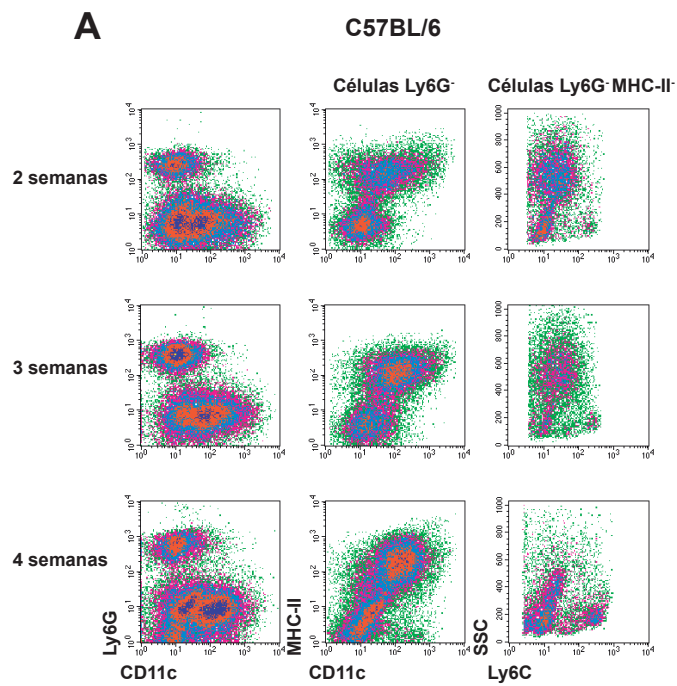
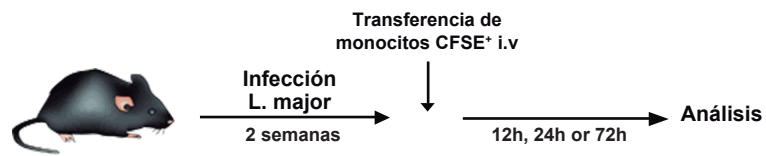


Figura 5



Tiempo tras la transferencia de monocitos

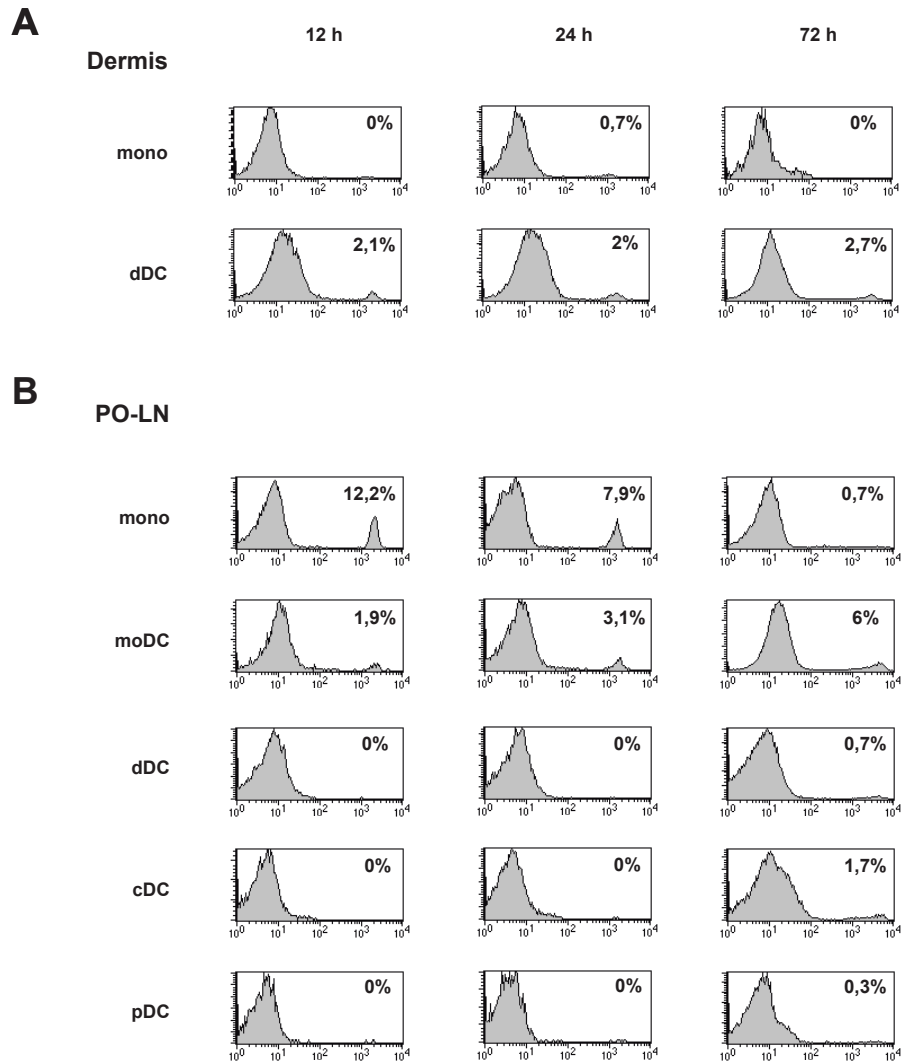
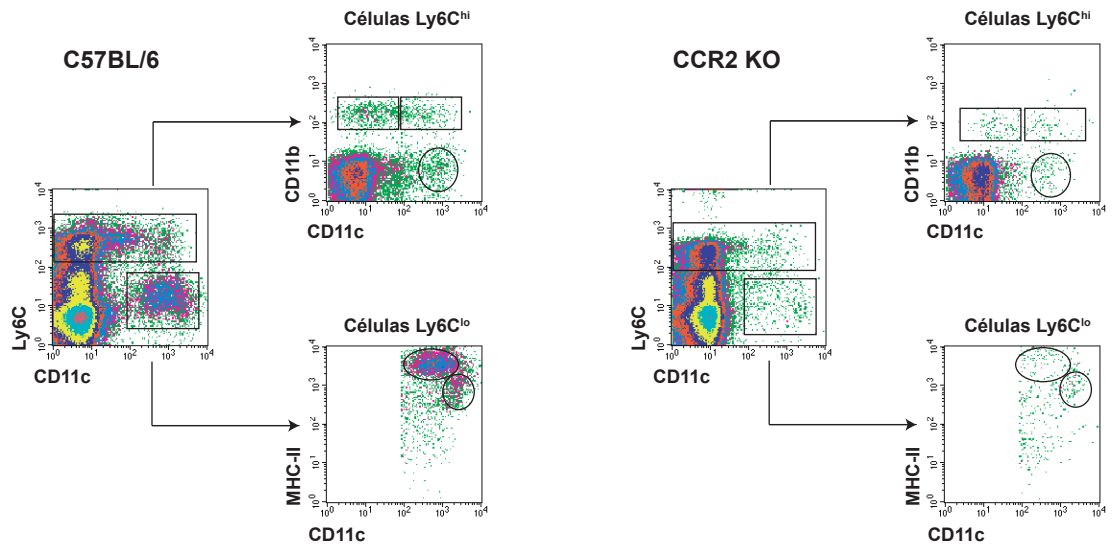


Figura 6

A

Sin Infectar



B

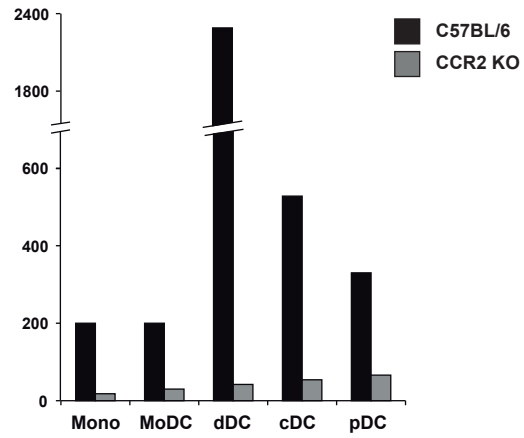
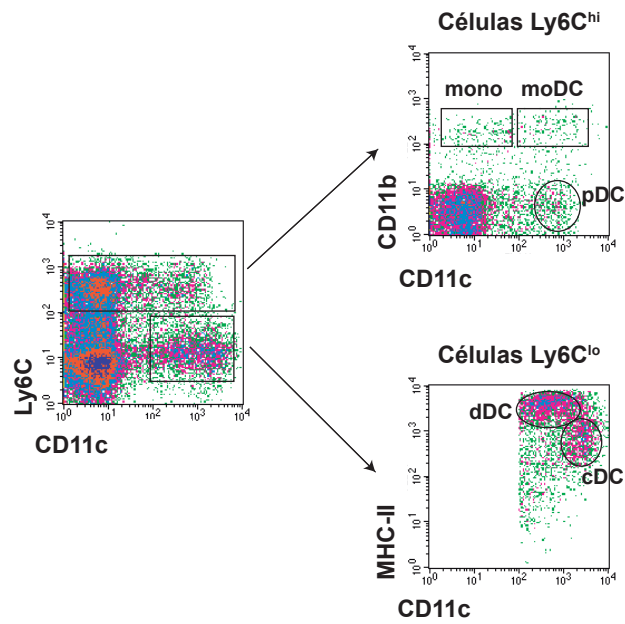


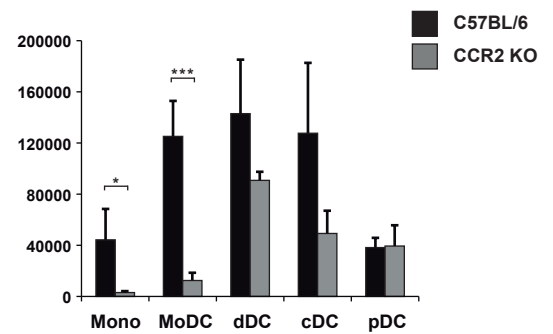
Figura 7

A

3 semanas post infección



B

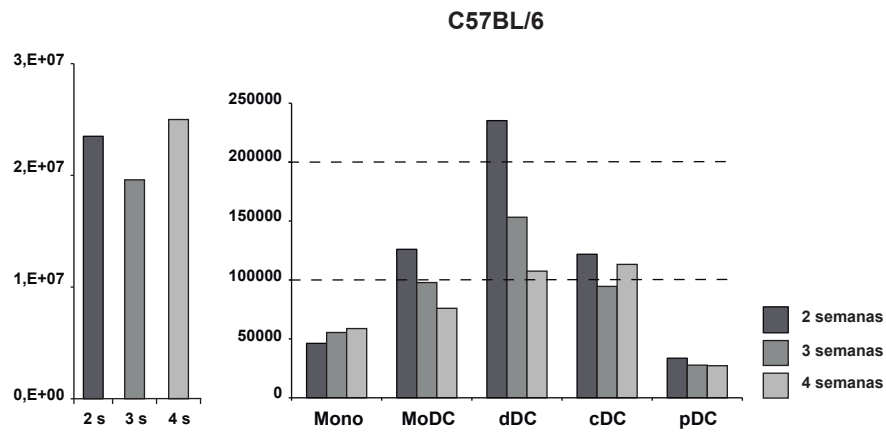
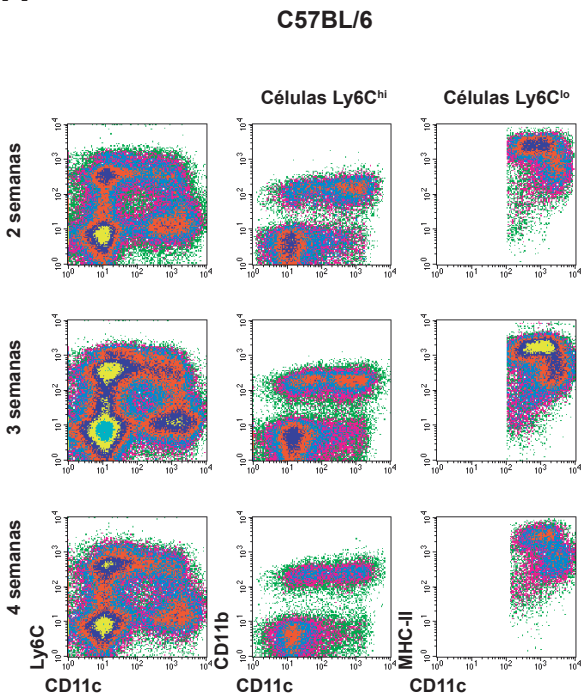


C



Figura 8

A



B

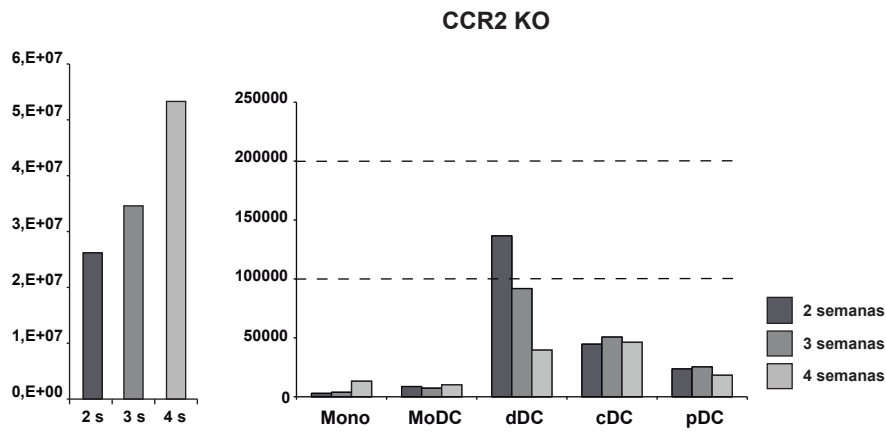
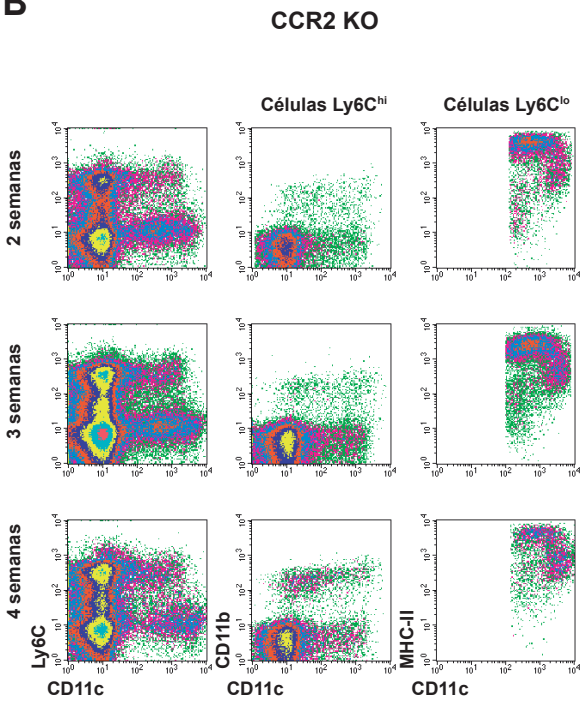
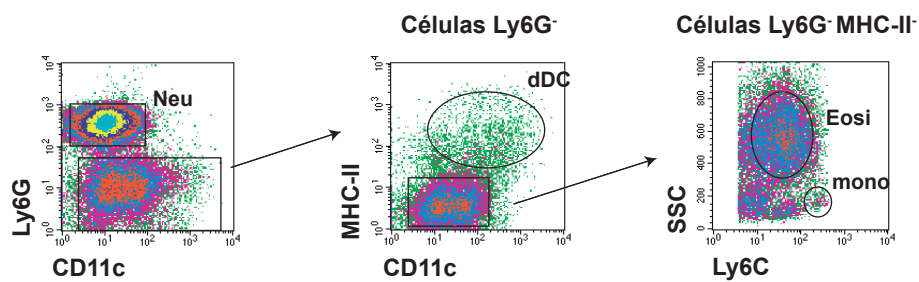


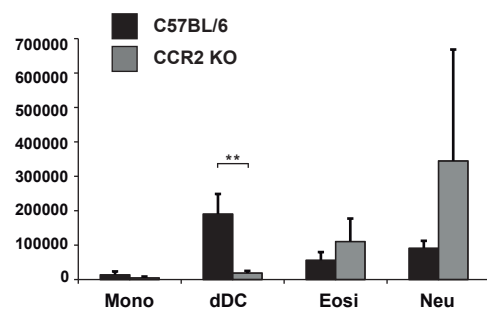
Figura 9

A

3 semanas post infección



B



C

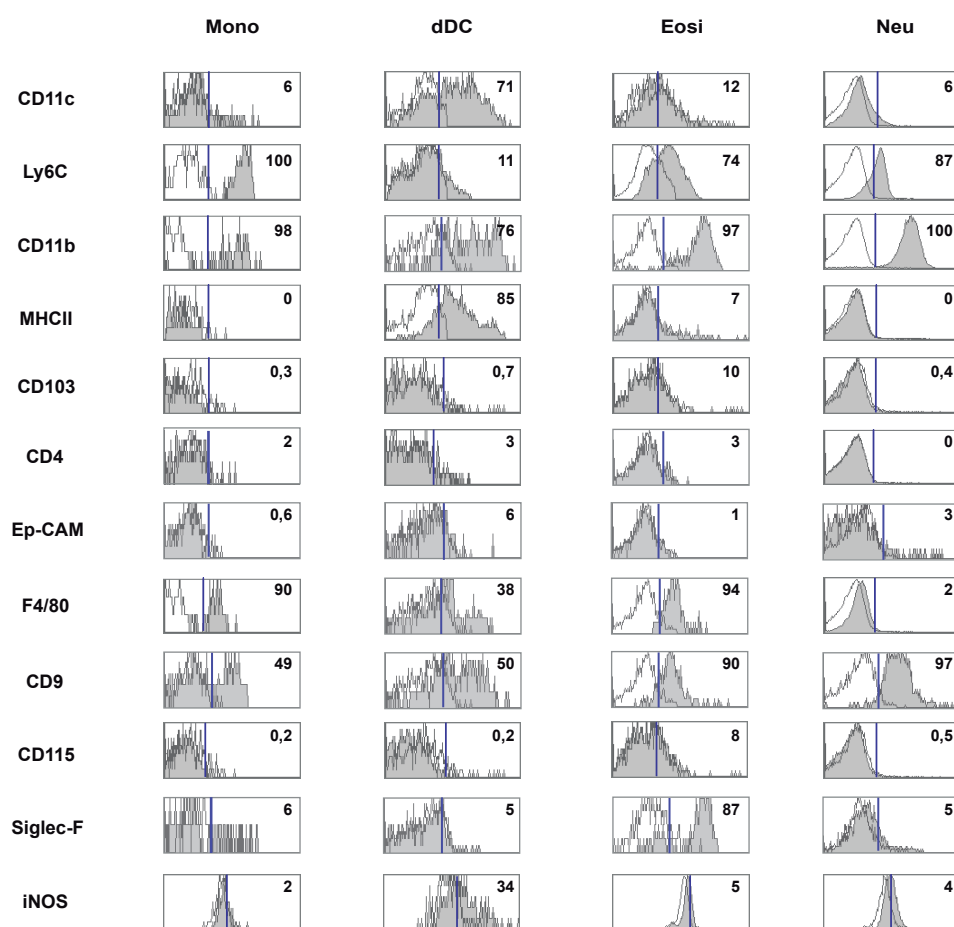
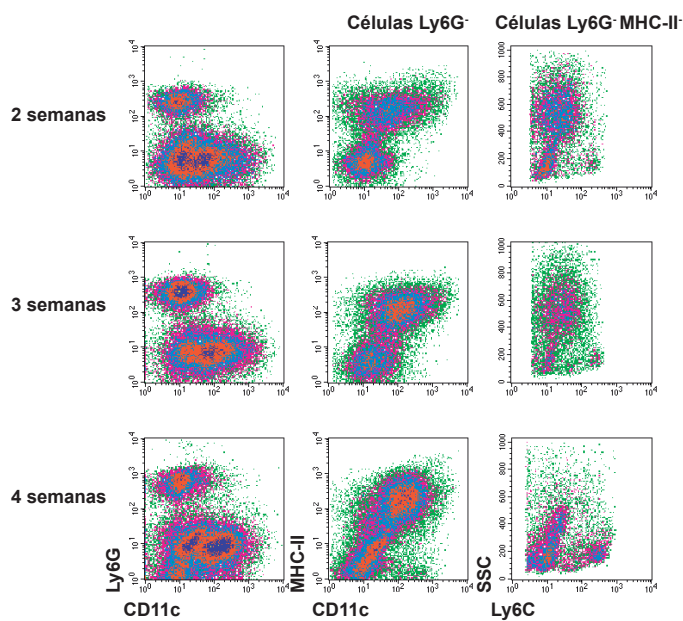


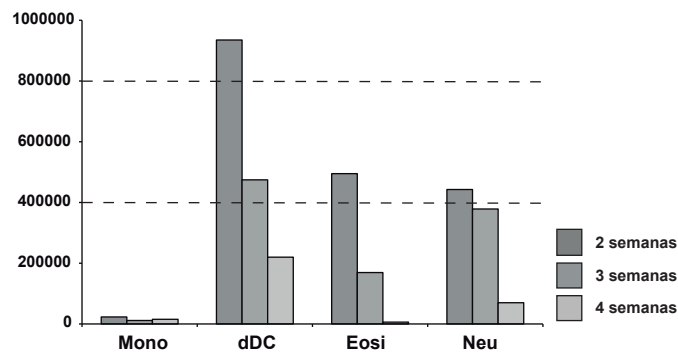
Figura 10

A

C57BL/6

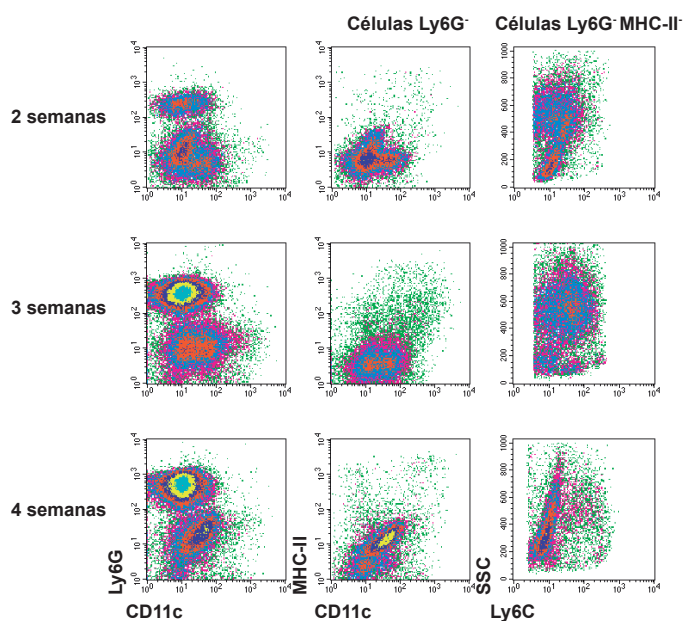


C57BL/6



B

CCR2 KO



CCR2 KO

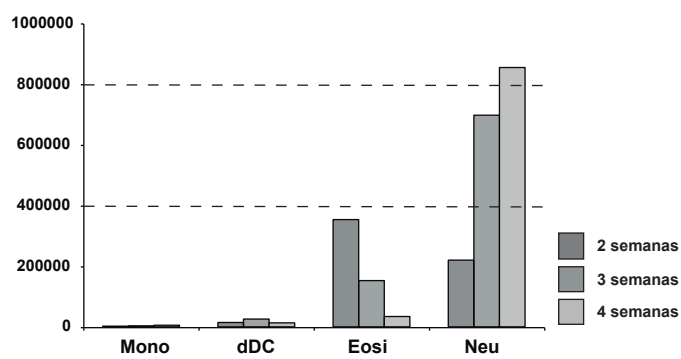
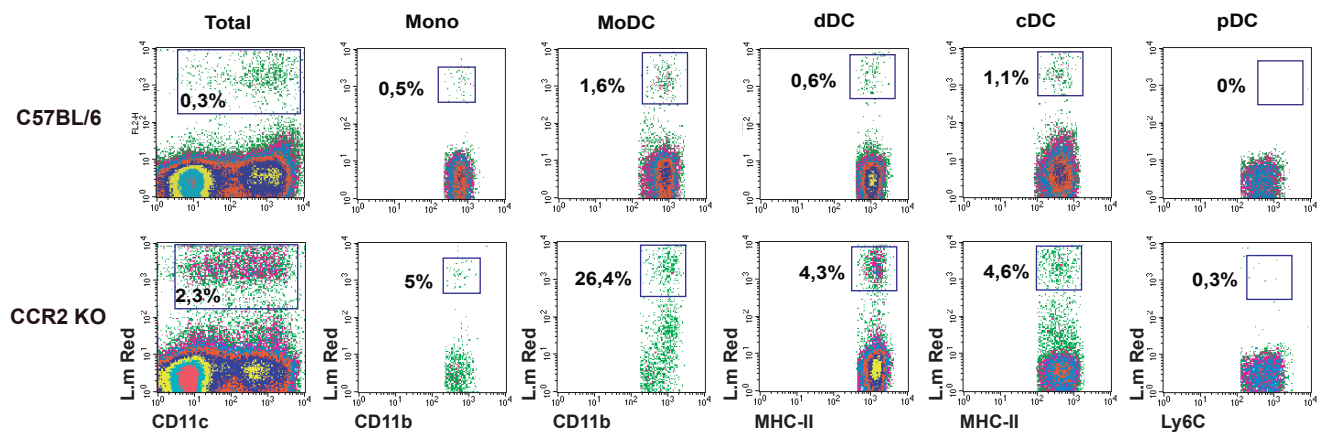


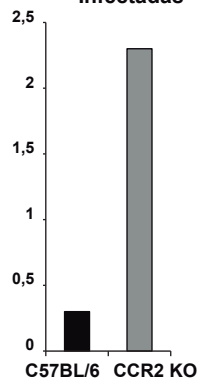
Figura 11

A

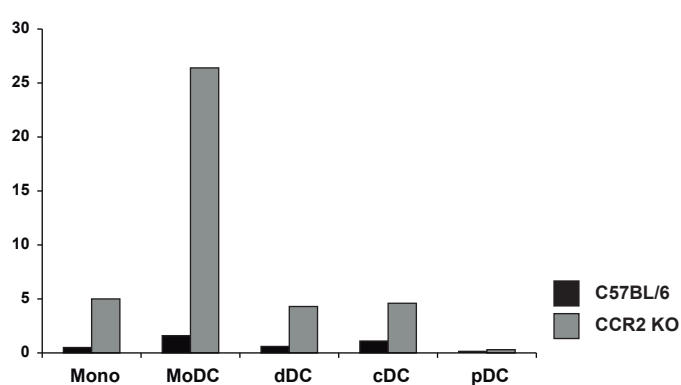
PO-LN



% Total de Células Infectadas

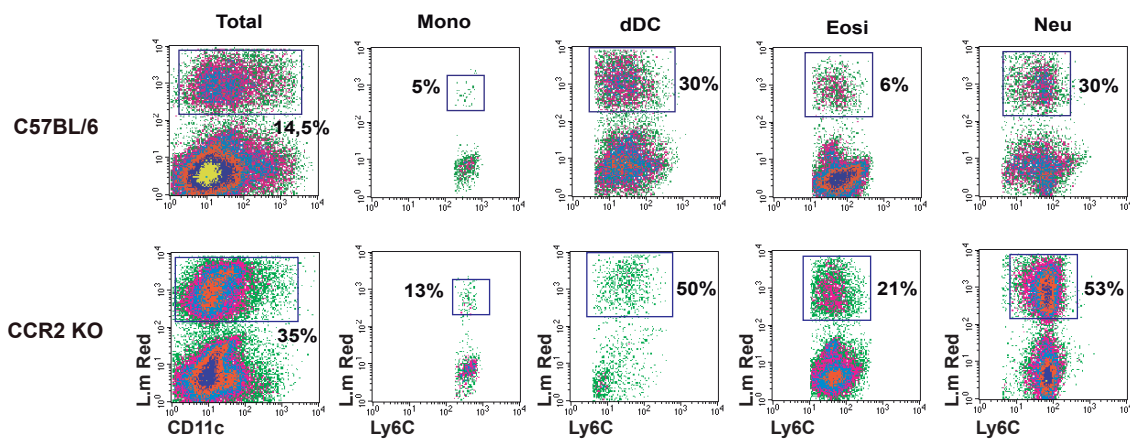


% Células Infectadas PoLN

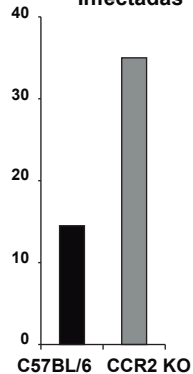


B

Dermis



% Total Células Infectadas



% Células Infectadas Dermis

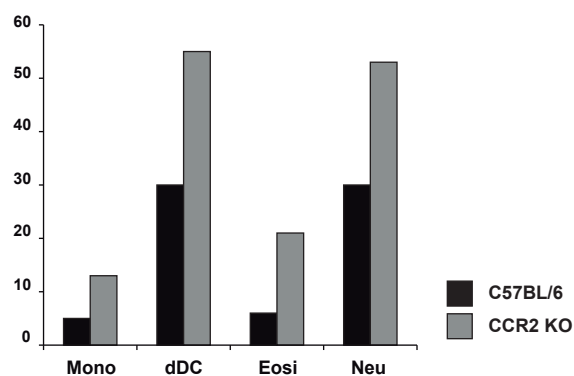
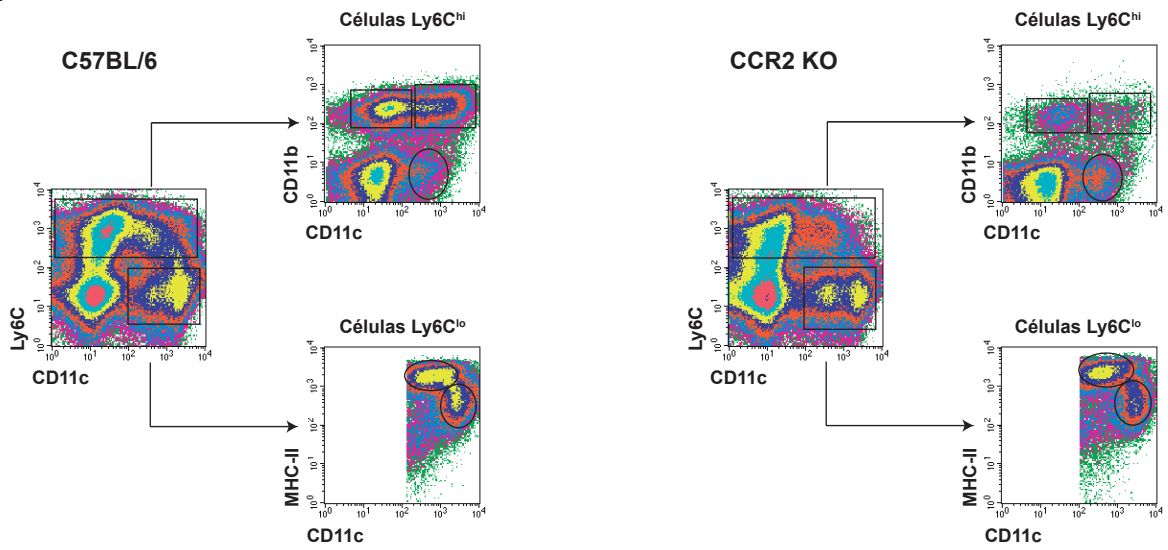
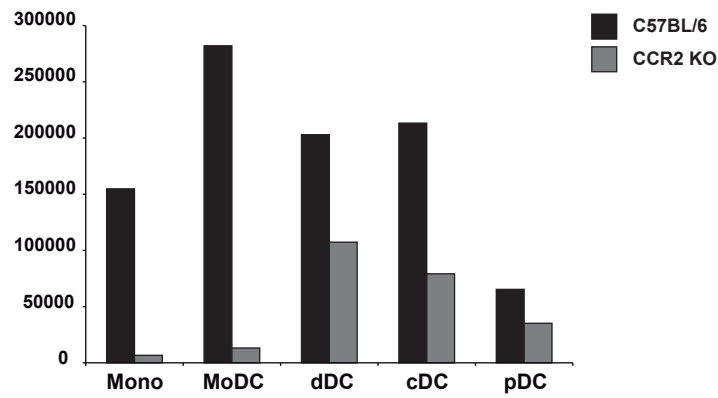


Figura 12

A



B



C

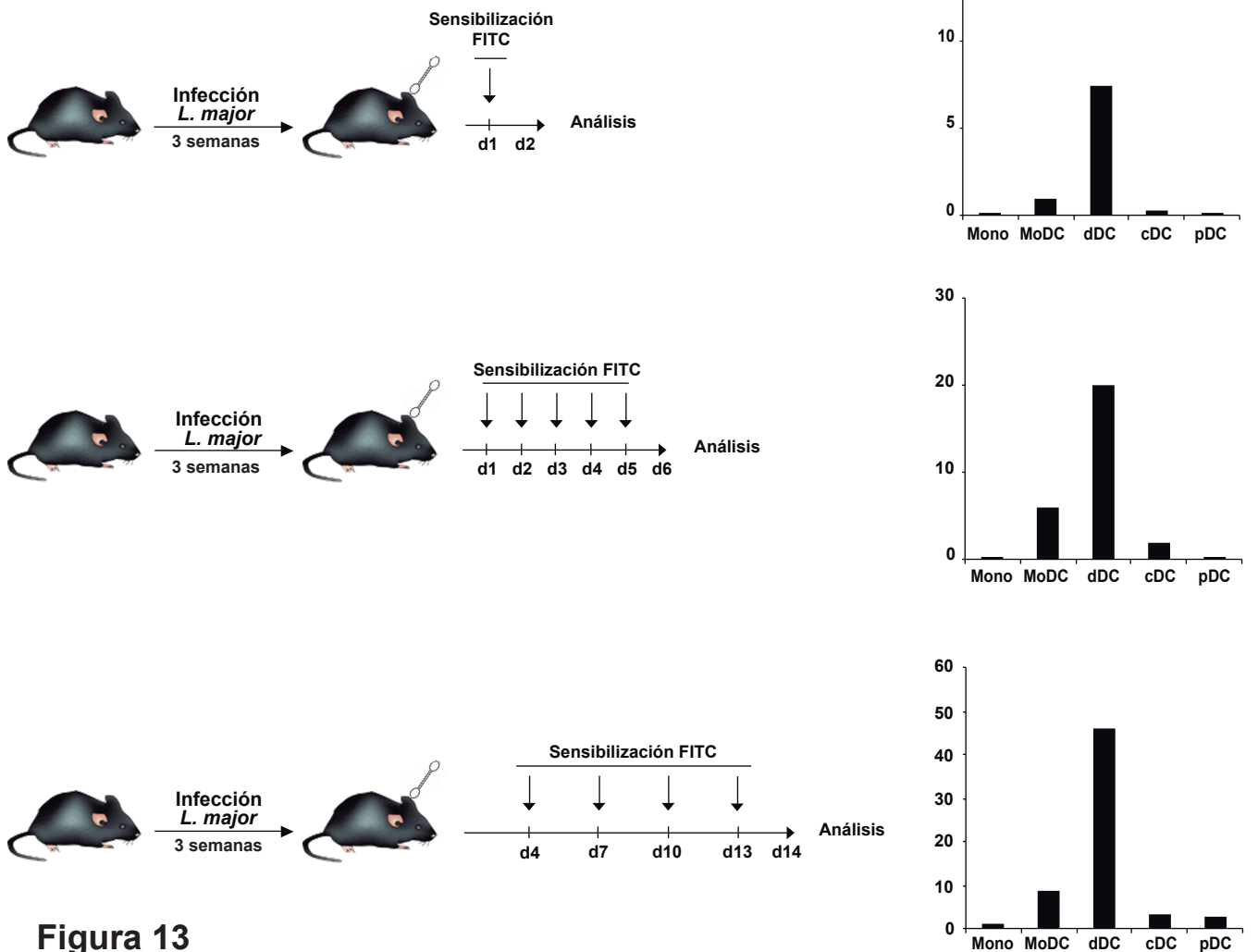
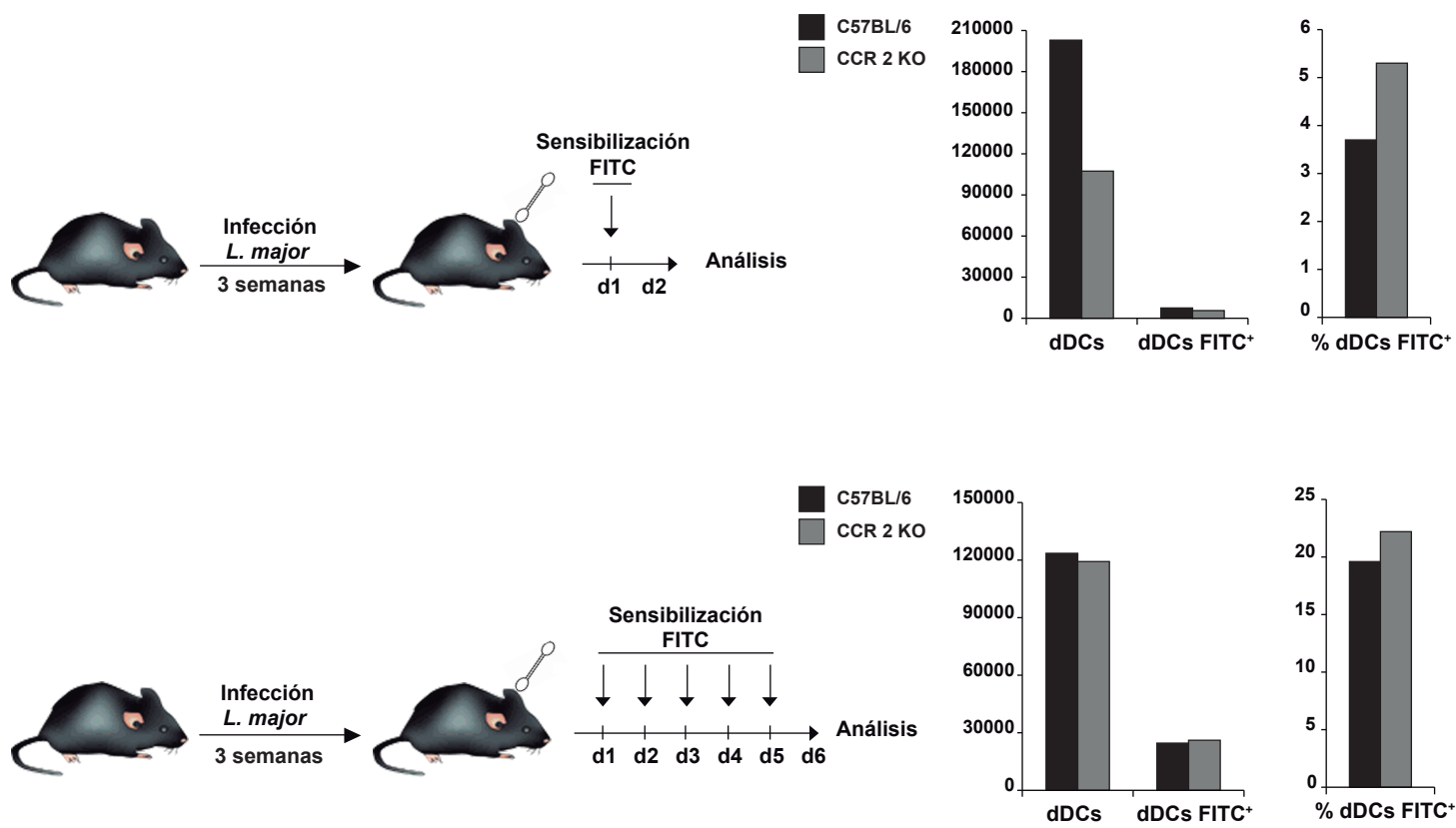


Figura 13

A



B

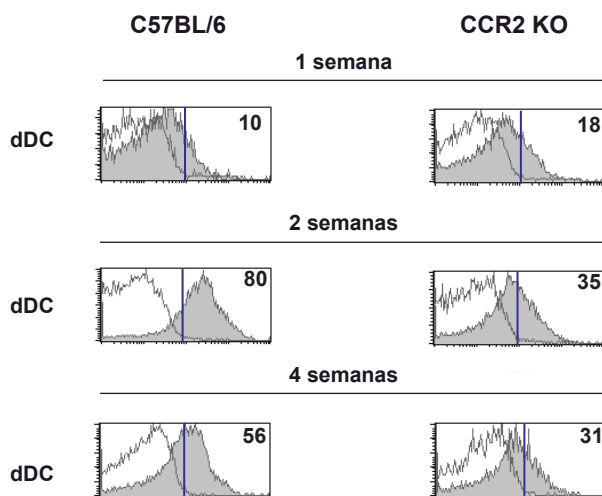


Figura 14

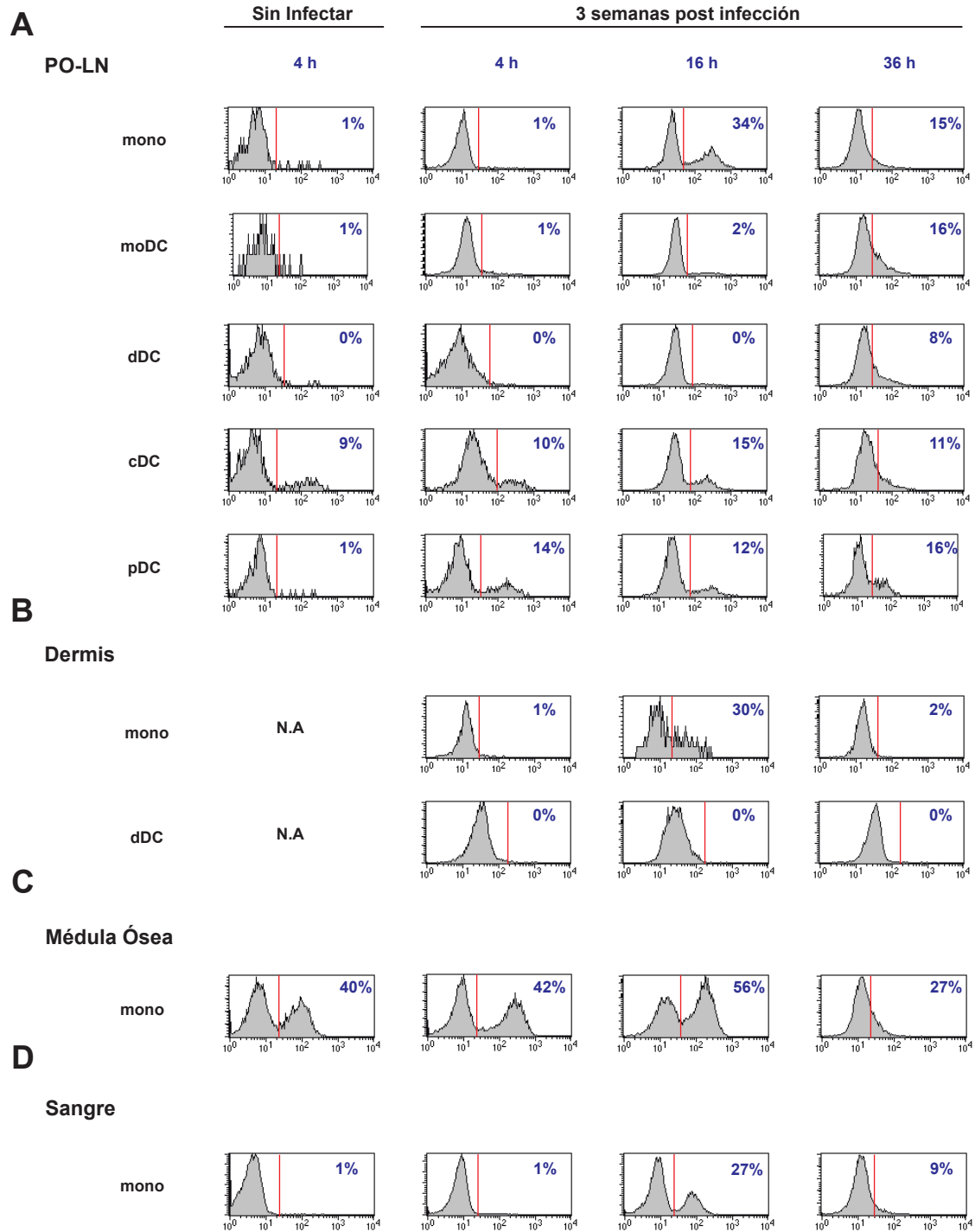
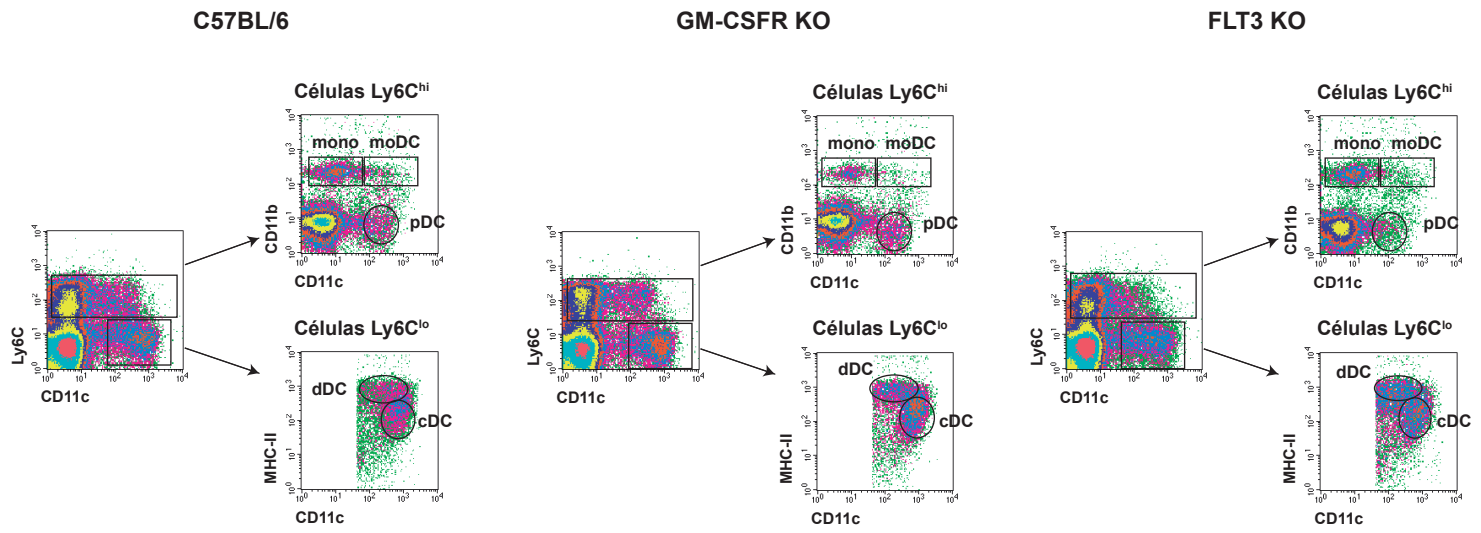


Figura 15

A



B

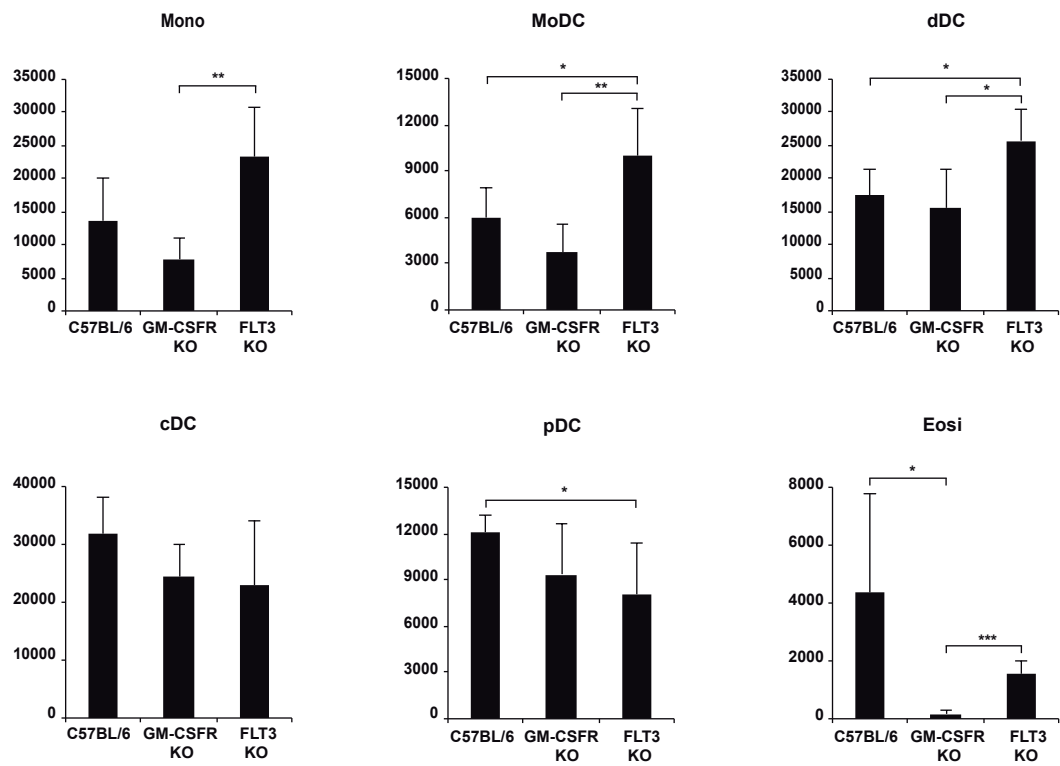
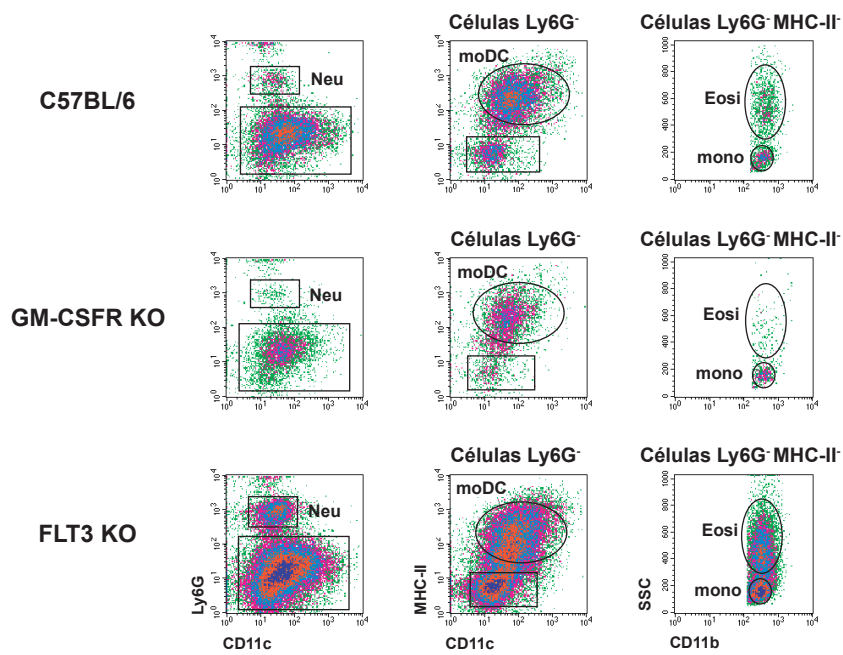


Figura 16

A



B

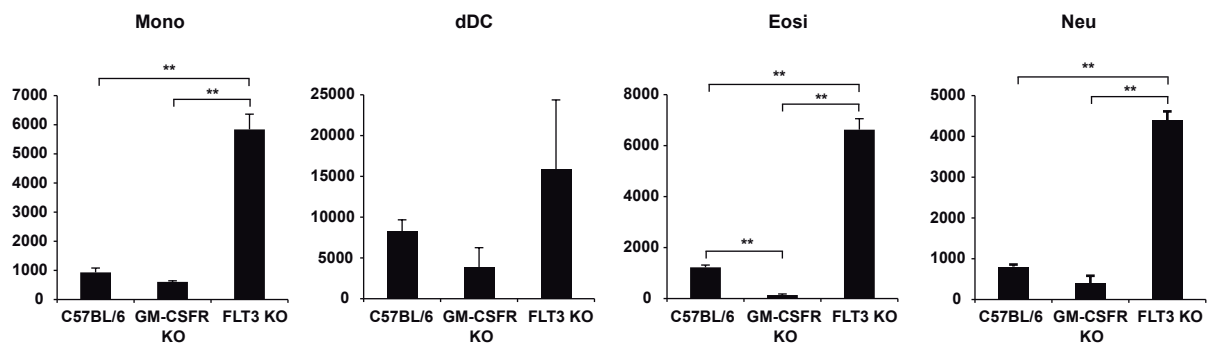


Figura 17

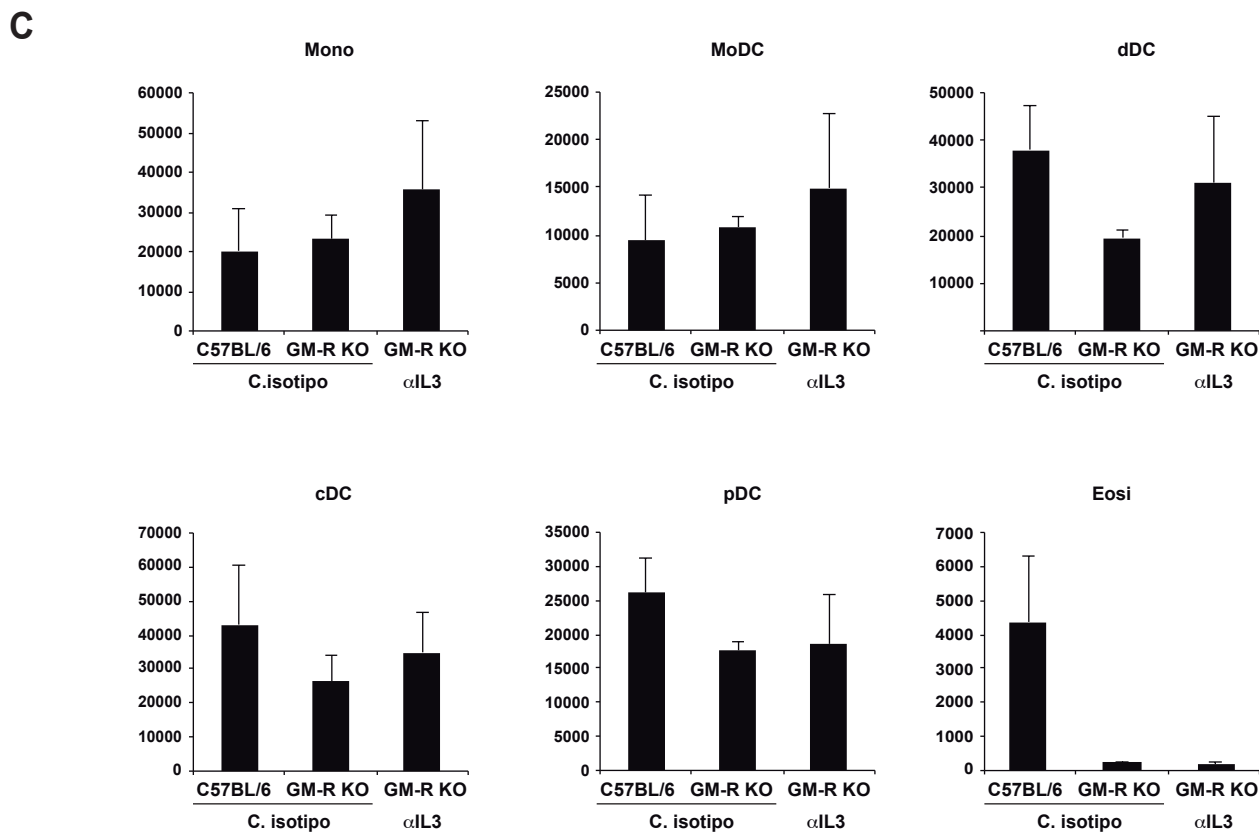
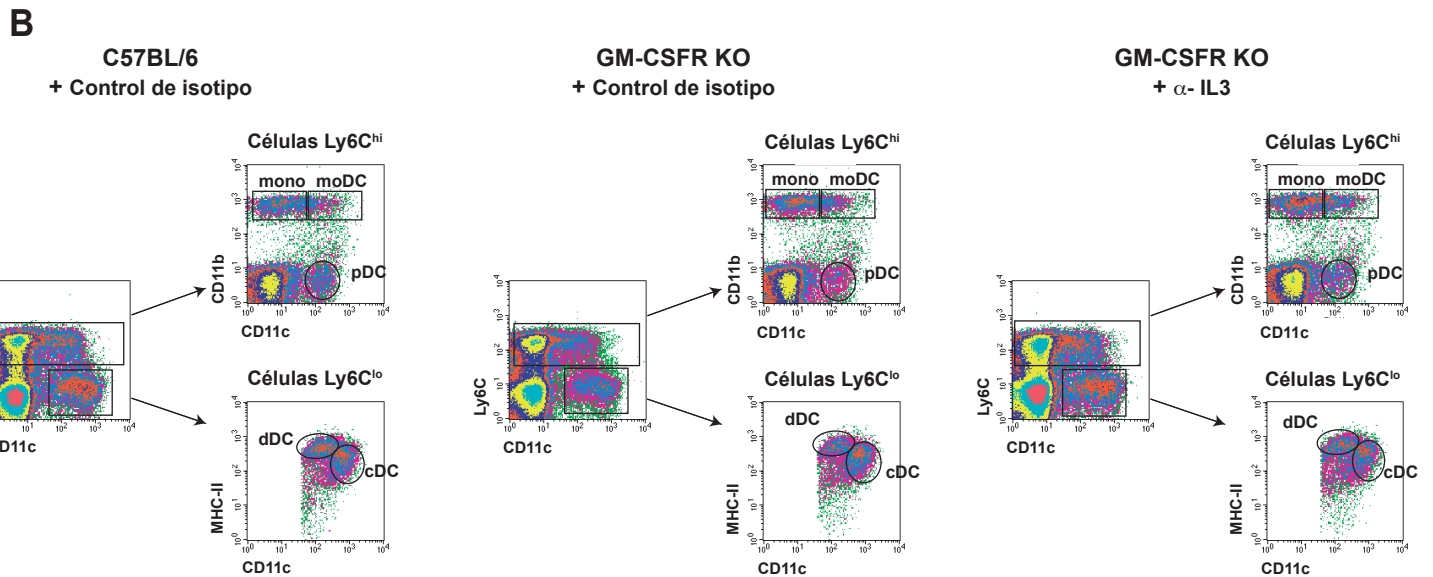
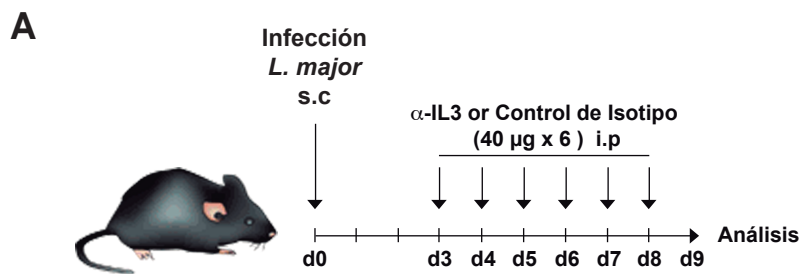


Figura 18

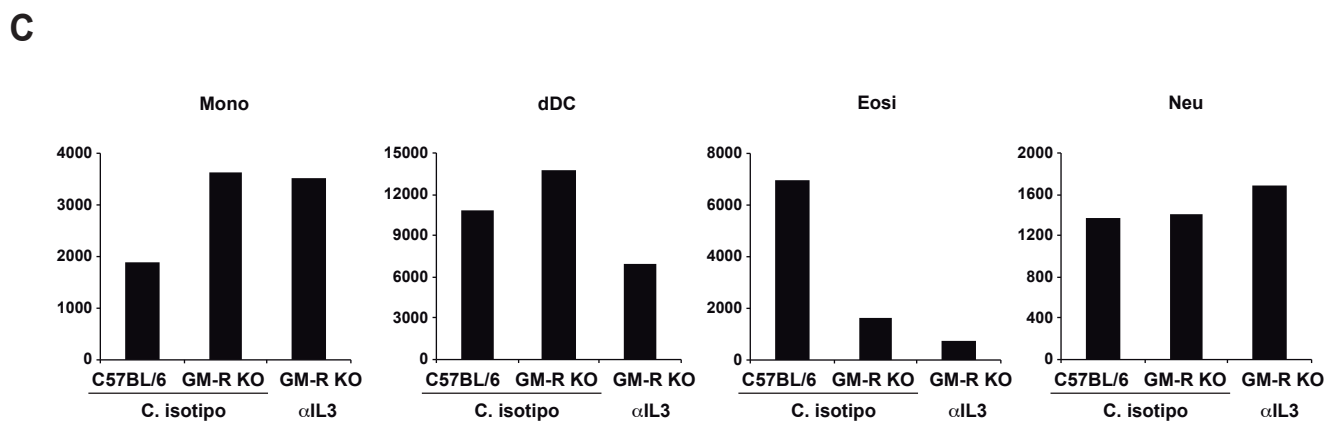
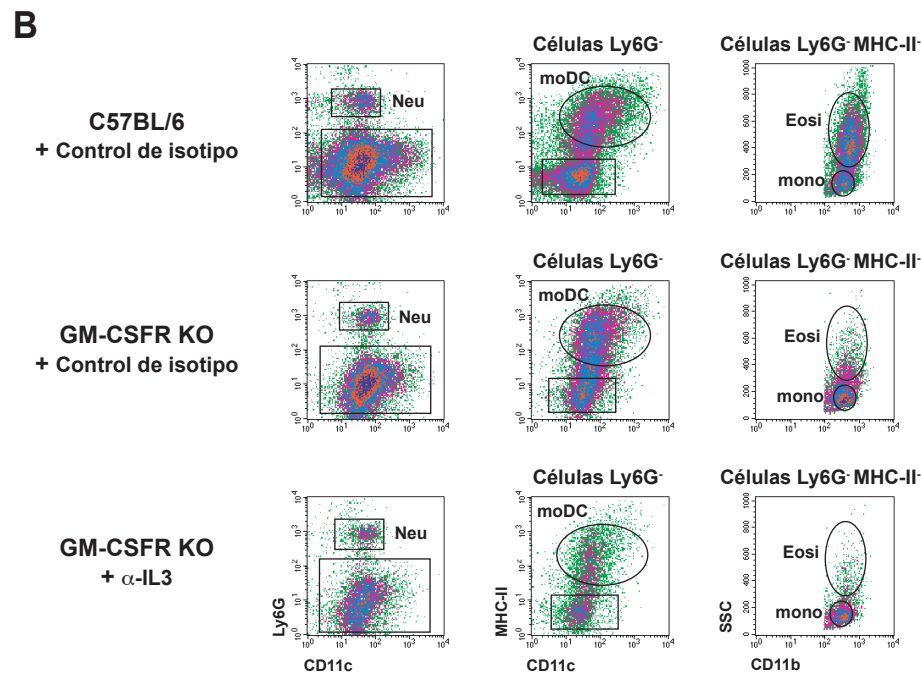
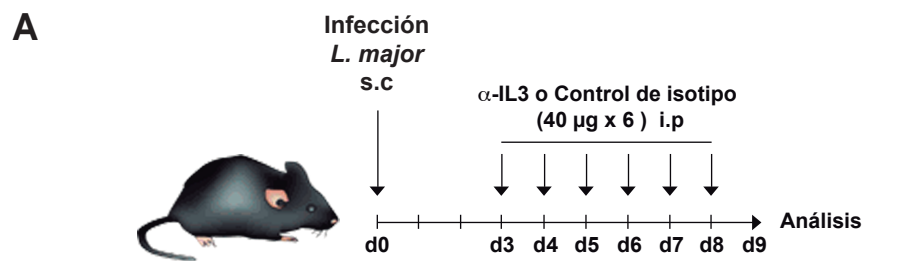
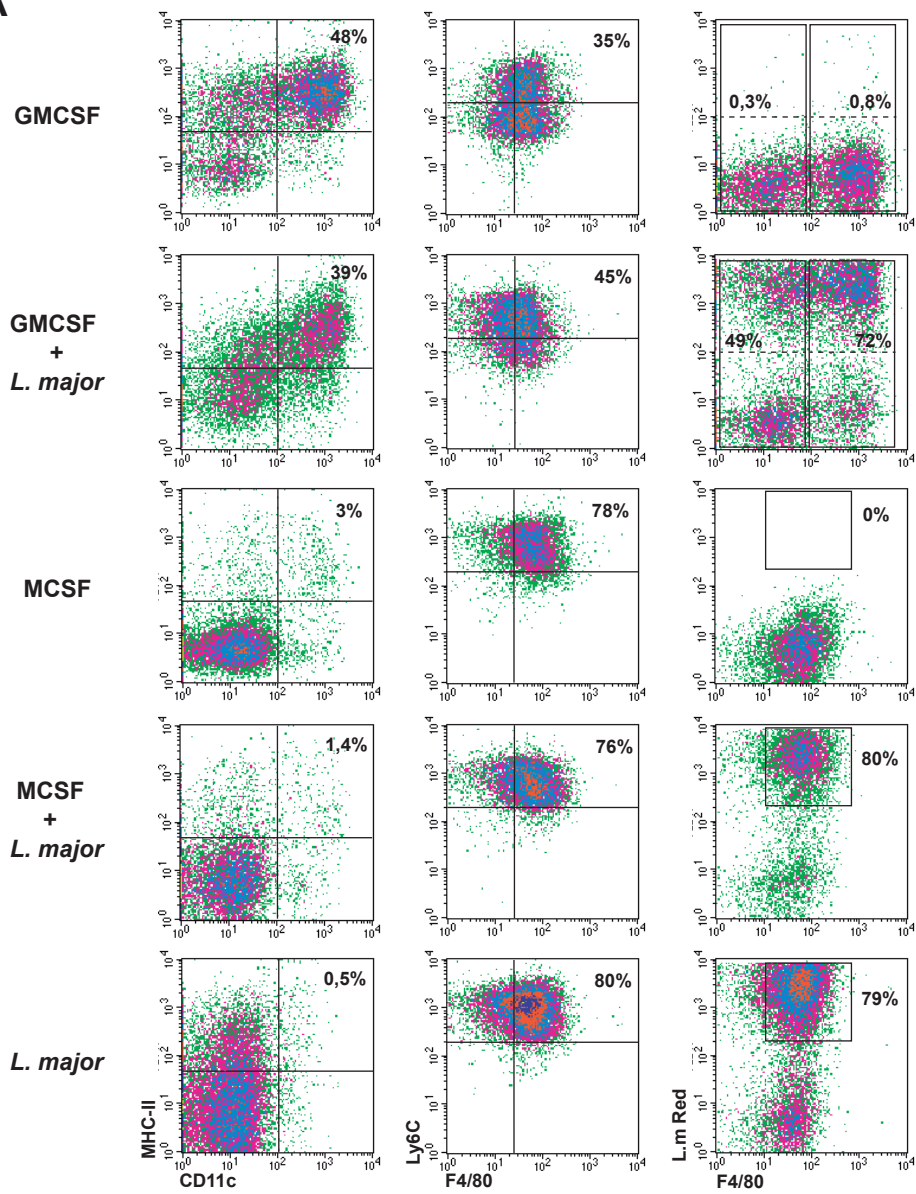


Figura 19

A



B

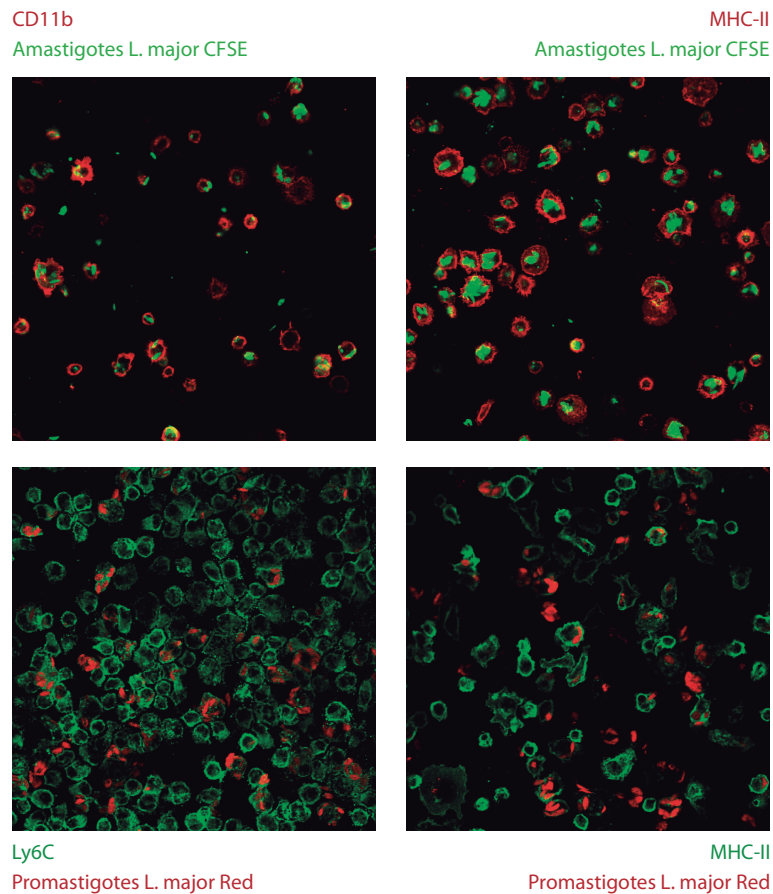


Figura 20

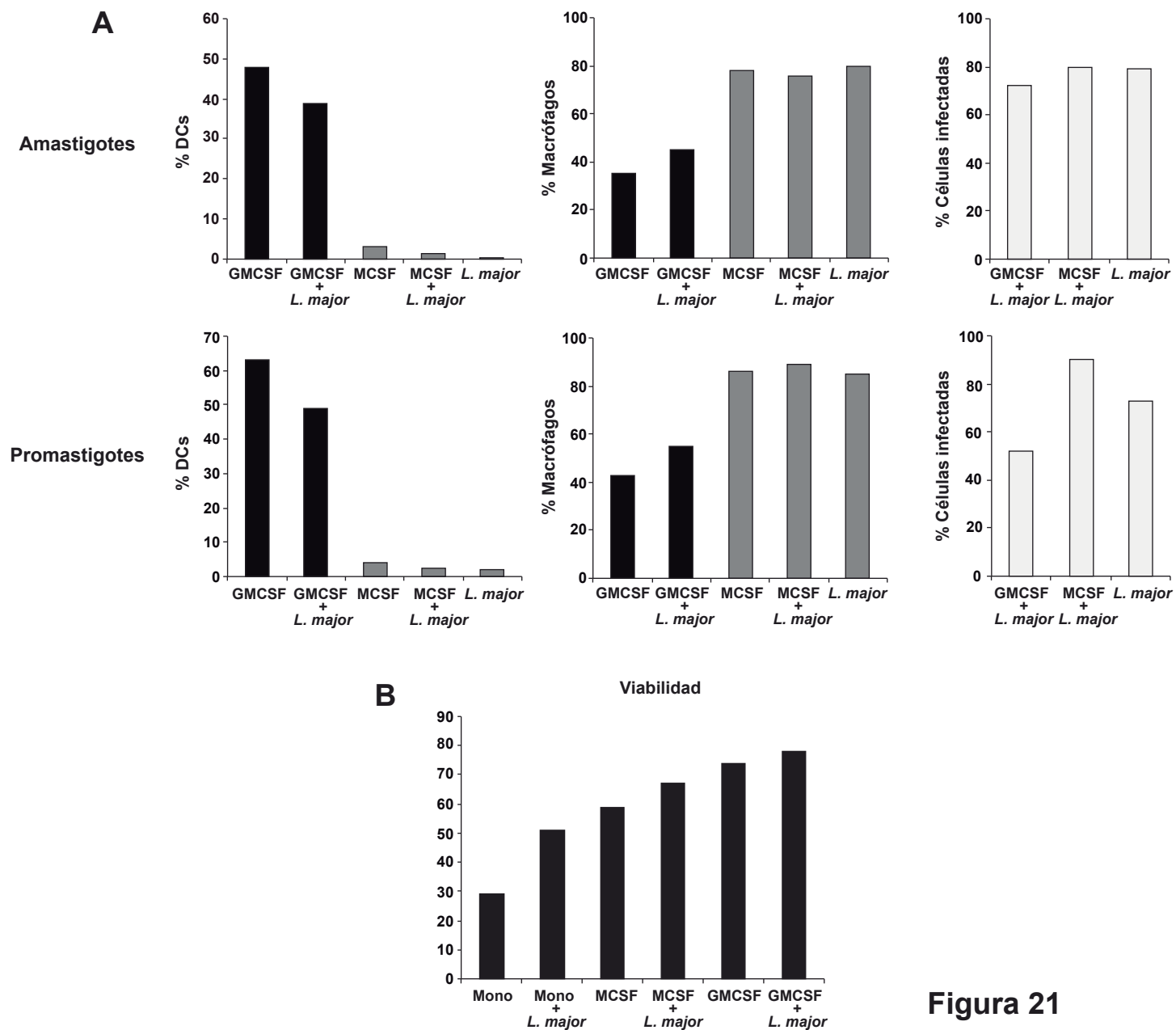


Figura 21

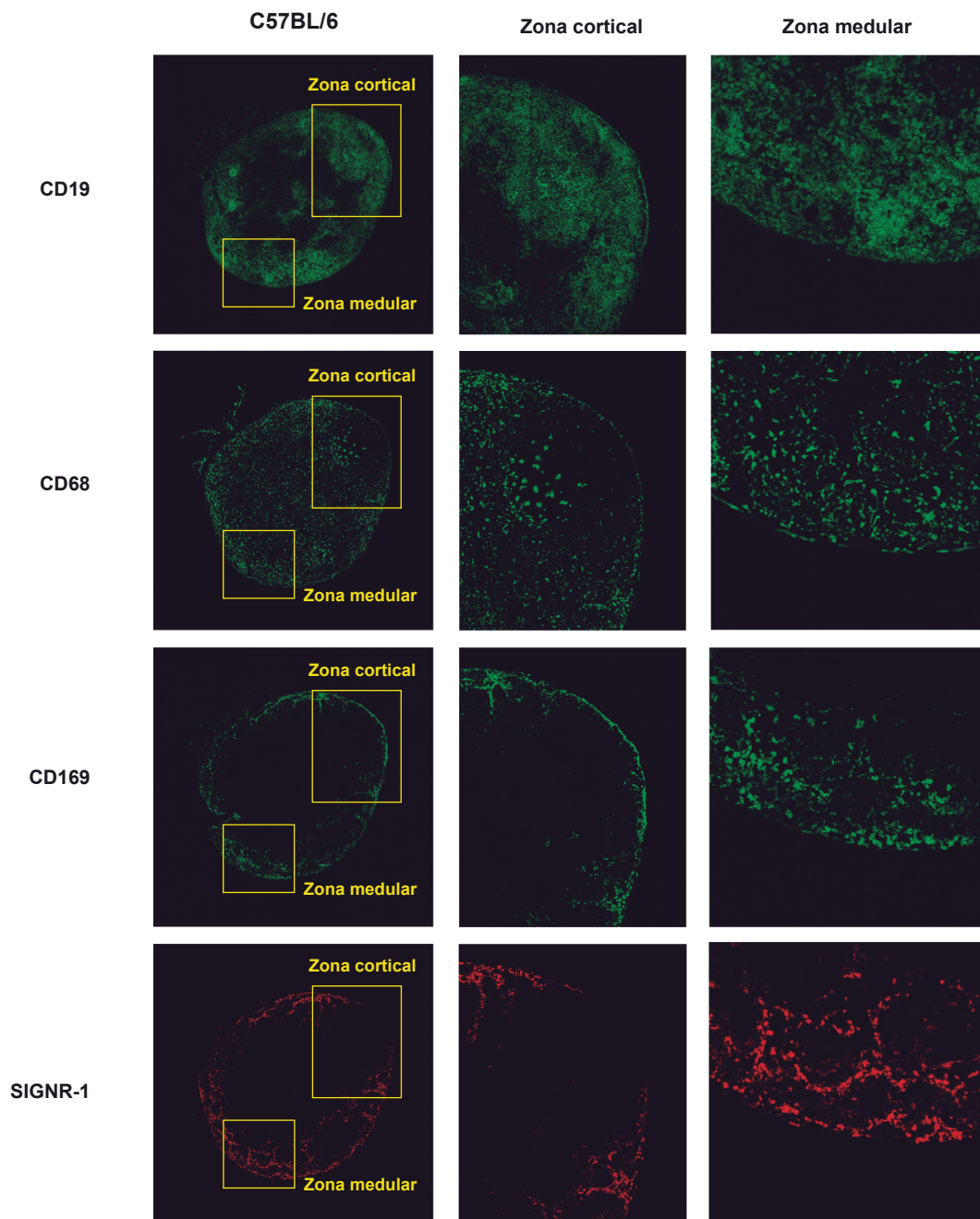


Figura 22

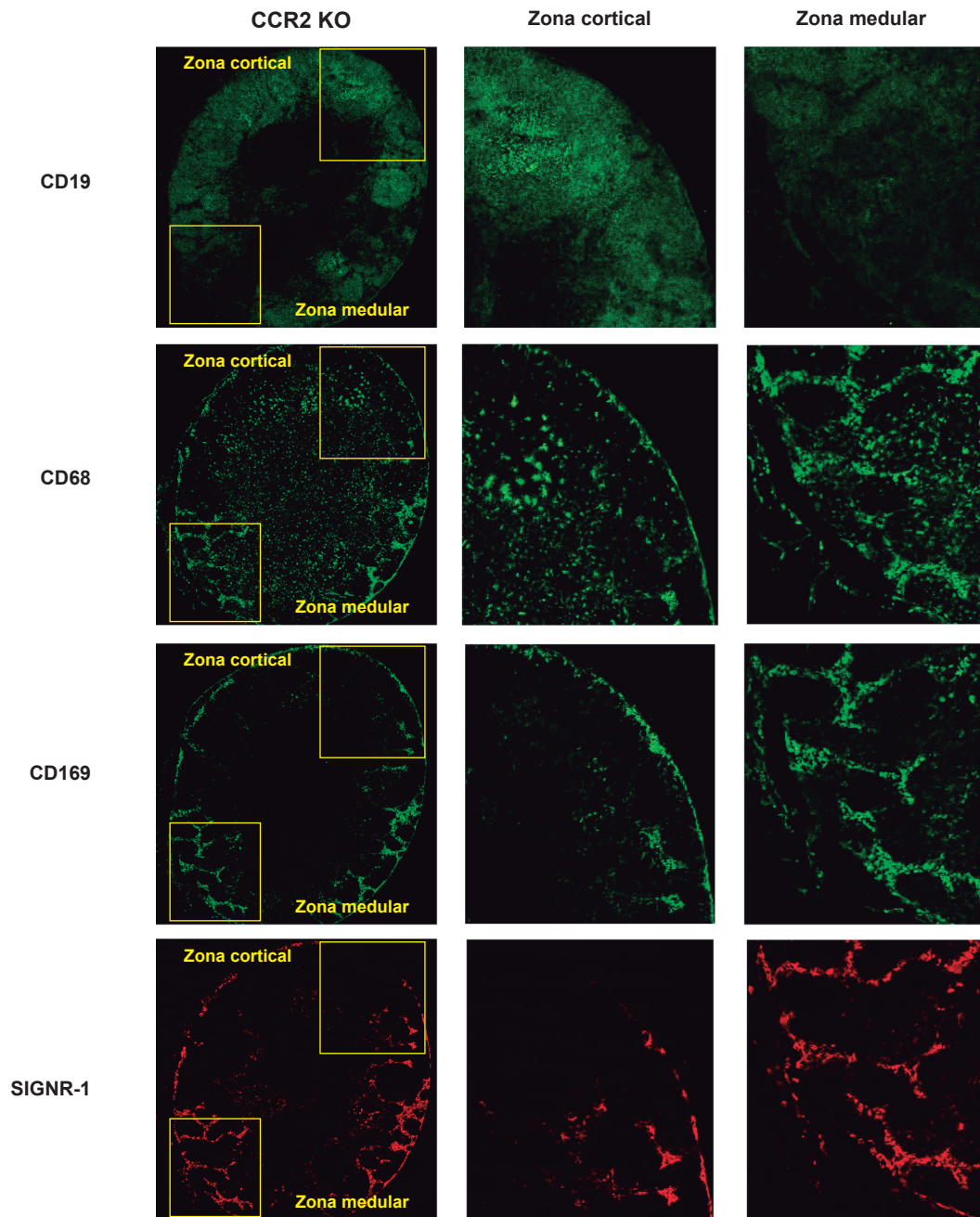


Figura 23

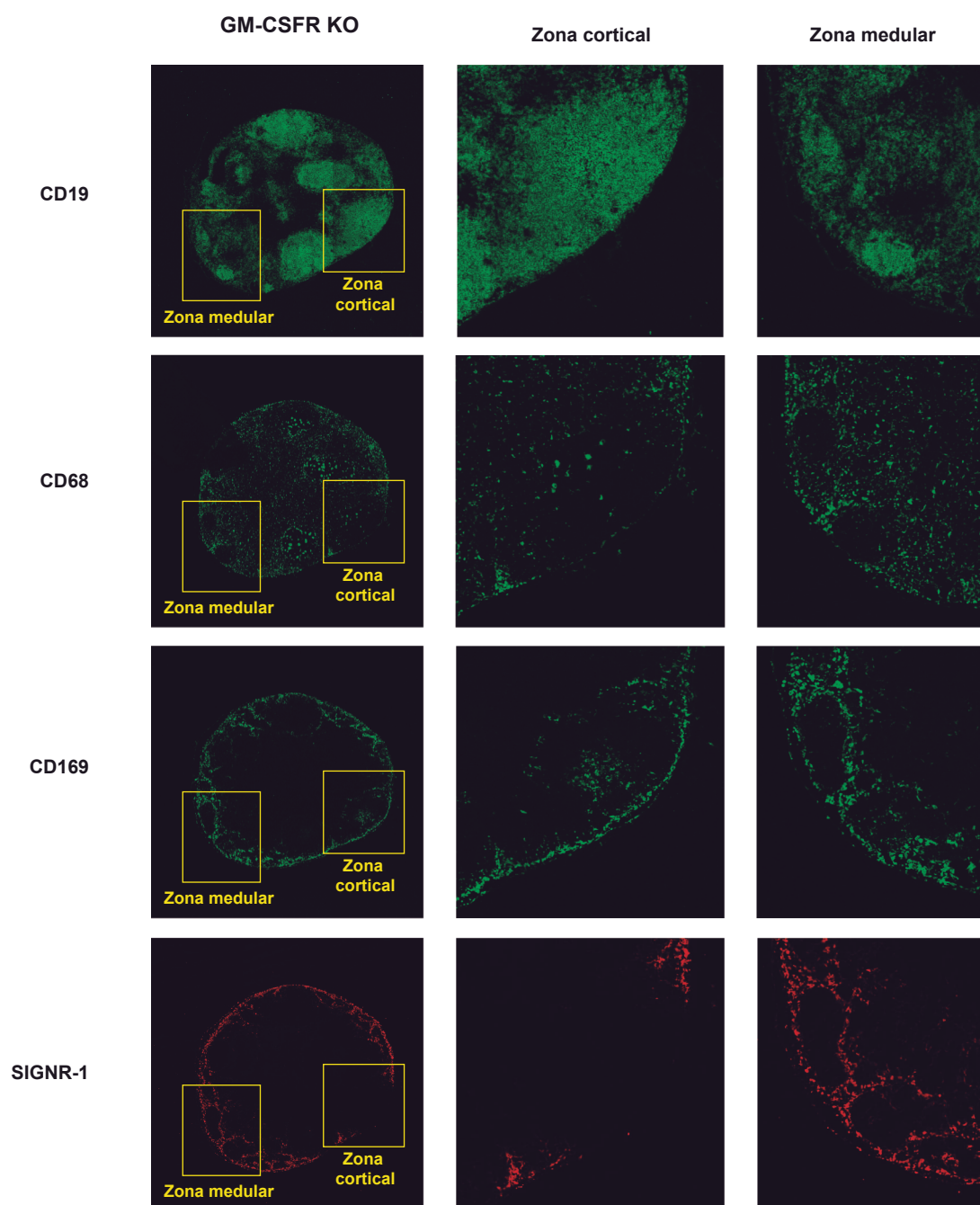


Figura 24

Figura 1. Variación en el número absoluto de las subpoblaciones de monocitos y DCs presentes en los PO-LNs de ratones C57BL/6 sin infectar y durante la infección con *Leishmania major*. A) Definición de las subpoblaciones celulares presentes en los PO-LNs de ratones C57BL/6 sin infectar, en base a los diferentes niveles de expresión de los marcadores de superficie indicados y análisis de los números absolutos de dichas subpoblaciones. B) Definición de las subpoblaciones celulares presentes en los PO-LNs de ratones C57BL/6, en base a los diferentes niveles de expresión de los marcadores de superficie indicados, 3 semanas después de la infección con *Leishmania major* y análisis de los números absolutos de dichas subpoblaciones.

Figura 2. Caracterización de las subpoblaciones de monocitos y DCs presentes en los PO-LNs de ratones C57BL/6 durante la infección con *Leishmania major*. A) Definición de las subpoblaciones de monocitos y DCs, en base a los diferentes niveles de expresión de los marcadores de superficie indicados, presentes en los PO-LNs de ratones C57BL/6, tres semanas después de la infección con *Leishmania major*, tras la depleción de células T, células B, células NK y neutrófilos. B) Análisis fenotípico de las subpoblaciones de monocitos y DCs presentes en los PO-LNs de ratones C57BL/6, tres semanas después de la infección con *Leishmania major*, en base a la expresión diferencial de los marcadores de superficie indicados en cada histograma.

Figura 3. Cinética de las subpoblaciones de monocitos y DCs presentes en los PO-LNs de ratones C57BL/6 durante la infección con *Leishmania major*. A) Definición de las subpoblaciones de monocitos y DCs presentes en los PO-LNs de ratones C57BL/6, 2, 3 y 4 semanas después de la infección con *Leishmania major*. B) Cambios en el número total y en los números de las distintas subpoblaciones de monocitos y DCs presentes en los PO-LNs de ratones C57BL/6, 2, 3 y 4 semanas después de la infección con *Leishmania major*. C) Cambios en los números de las subpoblaciones de monocitos y DCs presentes en los PO-LNs de ratones C57BL/6, 9 y 12 días después de la infección con *Leishmania major*.

Figura 4. Caracterización de las subpoblaciones celulares que infiltran la dermis de ratones C57BL/6 durante la infección con *Leishmania major*. A) Definición de las subpoblaciones celulares, en base a los diferentes niveles de expresión de los marcadores de superficie indicados, presentes en la dermis de ratones C57BL/6, 3 semanas después de la infección con *Leishmania major*. B) Análisis de los números absolutos de las distintas subpoblaciones celulares que infiltran la dermis de ratones C57BL/6, 3 semanas después de la infección con *Leishmania major*. C) Análisis fenotípico de las distintas subpoblaciones celulares que infiltran la dermis de ratones C57BL/6, 3 semanas después de la infección con *Leishmania major*, en base a los diferentes niveles de expresión de los marcadores de superficie indicados en cada histograma. D) Análisis morfológico de los eosinófilos mediante tinción con Giemsa tras su separación celular por citometría de flujo.

Figura 5. Cinética de las subpoblaciones celulares que infiltran la dermis de ratones C57BL/6 durante la infección con *Leishmania major*. A) Definición de las principales subpoblaciones celulares que infiltran la dermis de ratones C57BL/6, 2, 3 y 4 semanas después de la infección con *Leishmania major*, en base a los diferentes niveles de expresión de los marcadores de superficie indicados. B) Cambios en los números de las principales subpoblaciones celulares que infiltran la dermis de ratones C57BL/6, 2, 3 y 4 semanas después de la infección con *Leishmania major*. C) Cambios en los números de las principales subpoblaciones celulares que infiltran la dermis de ratones C57BL/6, 9 y 12 días después de la infección con *Leishmania major*.

Figura 6. Análisis del reclutamiento y la diferenciación *in vivo* de monocitos transferidos, a las distintas poblaciones de DCs en la dermis y en los PO-LNs de ratones C57BL/6 durante la infección con *Leishmania major*. A) Análisis de la diferenciación de monocitos a dDCs en la dermis, a las 12, 24 y 72 horas tras la transferencia por vía intravenosa en ratones C57BL/6, 2 semanas tras la infección con *Leishmania major*. B) Análisis de la diferenciación de monocitos a las distintas poblaciones de DCs en los PO-LNs, a las 12, 24 y 72 horas tras la transferencia por vía intravenosa en ratones C57BL/6, 2 semanas tras la infección con *Leishmania major*.

Figura 7. Caracterización de las subpoblaciones de monocitos y DCs presentes en los PO-LNs de ratones CCR2 KO sin infectar. A) Definición de las subpoblaciones de monocitos y DCs presentes en los PO-LNs, en base a los diferentes niveles de expresión de los marcadores de superficie indicados, en ratones CCR2 KO y C57BL/6 sin infectar. B) Análisis de los números de las distintas subpoblaciones de monocitos y DCs presentes en los PO-LNs de ratones CCR2 KO y C57BL/6 sin infectar.

Figura 8. Caracterización de las subpoblaciones de monocitos y DCs presentes en los PO-LNs de ratones CCR2 KO durante la infección con *Leishmania major*. A) Definición de las subpoblaciones de monocitos y DCs, en base a los diferentes niveles de expresión de los marcadores de superficie indicados, presentes en los PO-LNs de ratones CCR2 KO 3 semanas después de la infección con *Leishmania major*, tras la depleción de células T, células B, células NK y neutrófilos. B) Análisis comparativo de los números absolutos de las distintas subpoblaciones de monocitos y DCs presentes en los PO-LNs de ratones C57BL/6 y CCR2 KO, 3 semanas después de la infección con *Leishmania major*. C) Análisis fenotípico de las distintas subpoblaciones de monocitos y DCs presentes en los PO-LNs de ratones CCR2 KO, 3 semanas después de la infección con *Leishmania major*, en base a los diferentes niveles de expresión de los marcadores de superficie indicados en cada histograma.

Figura 9. Cinética de las subpoblaciones de monocitos y DCs presentes en los PO-LNs de ratones CCR2 KO durante la infección con *Leishmania major*. A) Definición de las principales

subpoblaciones de monocitos y DCs presentes en los PO-LNs de ratones C57BL/6, 2, 3 y 4 semanas después de la infección con *Leishmania major* y cambios en los números de dichas subpoblaciones. B) Definición de las principales subpoblaciones celulares presentes en los PO-LNs de ratones CCR2 KO, 2, 3 y 4 semanas después de la infección con *Leishmania major* y cambios en los números de dichas subpoblaciones.

Figura 10. Caracterización de las subpoblaciones celulares presentes en la dermis de ratones CCR2 KO durante la infección con *Leishmania major*. A) Definición de las subpoblaciones celulares, en base a los diferentes niveles de expresión de los marcadores de superficie indicados, que infiltran la dermis de ratones CCR2 KO 3 semanas después de la infección con *Leishmania major*. B) Análisis de los números absolutos de las distintas subpoblaciones celulares presentes en la dermis de ratones C57BL/6 y CCR2 KO 3 semanas después de la infección con *Leishmania major*. C) Análisis fenotípico de las distintas subpoblaciones celulares que infiltran la dermis de ratones CCR2 KO, 3 semanas después de la infección con *Leishmania major*, en base a los diferentes niveles de expresión de los marcadores de superficie indicados en cada histograma.

Figura 11. Cinética de las subpoblaciones celulares presentes en la dermis de ratones CCR2 KO durante la infección con *Leishmania major*. A) Definición de las principales subpoblaciones celulares que infiltran la dermis de ratones C57BL/6, 2, 3 y 4 semanas después de la infección con *Leishmania major* y cambios en los números absolutos de las mismas. B) Definición de las principales subpoblaciones celulares que infiltran la dermis de ratones CCR2 KO, 2, 3 y 4 semanas después de la infección con *Leishmania major* y cambios en los números absolutos de las mismas.

Figura 12. Análisis comparativo del grado de infección de las distintas subpoblaciones de monocitos y DCs presentes en los PO-LNs y en la dermis de ratones C57BL/6 y ratones CCR2 KO. A) Caracterización de las distintas subpoblaciones de DCs infectadas, presentes en los PO-LNs de ratones C57BL/6 y CCR2 KO, infectados con *Leishmania major* Red. Porcentaje total de células infectadas en los PO-LNs de ratones C57BL/6 y CCR2 KO. Porcentajes relativos de las células infectadas de las distintas subpoblaciones, presentes en los PO-LNs de ratones C57BL/6 y CCR2 KO 3 semanas después de la infección con *Leishmania major* Red. B) Caracterización de las distintas subpoblaciones de DCs infectadas, que infiltran la dermis de ratones C57BL/6 y CCR2 KO infectados con *Leishmania major* Red. Porcentaje total de células infectadas que infiltran la dermis de ratones C57BL/6 y CCR2 KO. Porcentajes relativos de las células infectadas de las distintas subpoblaciones, que infiltran la dermis de ratones C57BL/6 y CCR2 KO 3 semanas después de la infección con *Leishmania major* Red.

Figura 13. Análisis de la migración de las dDCs, desde la dermis a los ganglios auriculares, en ratones C57BL/6 y CCR2 KO infectados en la oreja con *Leishmania major*. A) Definición de las

subpoblaciones celulares presentes en los ganglios auriculares de ratones C57BL/6 y CCR2 KO en base a los diferentes niveles de expresión de los marcadores de superficie indicados, 3 semanas después de la infección con *Leishmania major*. B) Análisis de los números de las distintas subpoblaciones celulares presentes en los ganglios auriculares de ratones C57BL/6 y CCR2 KO 3 semanas después de la infección en la oreja con *Leishmania major*. C) Estudio de la migración de las dDCs a los ganglios auriculares de ratones C57BL/6 y CCR2 KO, 3 semanas después de la infección en la oreja con *Leishmania major*, siguiendo el modelo experimental ilustrado en cada esquema para la aplicación de la solución de FITC.

Figura 14. Análisis comparativo del potencial de migración de las dDCs desde la dermis a los ganglios auriculares en ratones C57BL/6 y CCR2 KO infectados con *Leishmania major*. A) Análisis de los números y los porcentajes de las dDCs FITC⁺ presentes en los ganglios auriculares de ratones C57BL/6 y CCR2 KO, 3 semanas después de la infección en la oreja con *Leishmania major*, y siguiendo el modelo experimental ilustrado en cada esquema para la aplicación de la solución de FITC. B) Análisis de la expresión de CCR7 de las dDCs presentes en los PO-LNs de ratones C57BL/6 y CCR2 KO, 1, 2 y 4 semanas después de la infección en la pata con *Leishmania major*.

Figura 15. Análisis del estado de proliferación de las distintas subpoblaciones de monocitos y DCs durante la infección con *Leishmania major* en ratones C57BL/6. A) Análisis de la incorporación de BrdU a las 4, 16 y 36 horas desde su administración, de los monocitos presentes en la médula ósea de ratones C57BL/6 sin infectar y 3 semanas después de la infección con *Leishmania major*. B) Análisis de la incorporación de BrdU a las 4, 16 y 36 horas desde su administración, de los monocitos presentes en la sangre de ratones C57BL/6 sin infectar y 3 semanas después de la infección con *Leishmania major*. C) Análisis de la incorporación de BrdU a las 4, 16 y 36 horas desde su administración, de las distintas subpoblaciones de monocitos y DCs presentes en los PO-LNs de ratones C57BL/6 sin infectar y 3 semanas después de la infección con *Leishmania major*. D) Análisis de la incorporación de BrdU a las 4, 16 y 36 horas desde su administración, de los monocitos y dDCs que infiltran la dermis ratones C57BL/6 sin infectar y 3 semanas después de la infección con *Leishmania major*.

Figura 16. Análisis de los factores implicados en la diferenciación *in vivo* de monocitos a DCs en los PO-LNs durante la infección con *Leishmania major*. A) Definición de las subpoblaciones de monocitos y DCs presentes en los PO-LNs de ratones C57BL/6, GM-CSFR KO y FLT3 KO, 9 días tras la infección con *Leishmania major*. B) Análisis de los números absolutos de las distintas subpoblaciones de monocitos y DCs presentes en los PO-LNs de ratones C57BL/6, GM-CSFR KO y FLT3 KO, 9 días tras la infección con *Leishmania major*.

Figura 17. Análisis de los factores implicados en la diferenciación *in vivo* de monocitos a DCs en la dermis durante la infección con *Leishmania major*. A) Definición de las subpoblaciones celulares presentes en la dermis de ratones C57BL/6, GM-CSFR KO y FLT3 KO, 9 días tras la infección con *Leishmania major*. B) Análisis de los números absolutos de las distintas subpoblaciones celulares presentes en la dermis de ratones C57BL/6, GM-CSFR KO y FLT3 KO, 9 días tras la infección con *Leishmania major*.

Figura 18. Análisis del efecto de IL-3 en la diferenciación *in vivo* de monocitos a DCs en los PO-LNs de ratones GM-CSFR KO durante la infección con *Leishmania major*. A) Esquema del modelo experimental utilizado para analizar el efecto de IL-3 durante la diferenciación *in vivo* de los monocitos a DCs. B) Definición de las subpoblaciones de monocitos y DCs, en base a los distintos niveles de expresión de los marcadores de superficie indicados, presentes en los PO-LNs de ratones C57BL/6 y GM-CSFR KO, 9 días tras la infección con *Leishmania major* y después de ser tratados con 40µg del anticuerpo α -IL-3 o de su correspondiente control de isotipo, durante 6 días. C) Análisis de los números absolutos de las distintas subpoblaciones de monocitos y DCs presentes en los PO-LNs de ratones C57BL/6 y GM-CSFR KO, 9 días tras la infección con *Leishmania major* y después del tratamiento descrito en B.

Figura 19. Análisis del efecto de IL-3 en la diferenciación *in vivo* de monocitos a DCs en la dermis de ratones GM-CSFR KO durante la infección con *Leishmania major*. A) Esquema del modelo experimental utilizado para analizar el efecto de la IL-3 durante la diferenciación *in vivo* de los monocitos a DCs. B) Definición de las subpoblaciones celulares, en base a los diferentes niveles de expresión de los marcadores de superficie indicados, presentes en la dermis de ratones C57BL/6 y GM-CSFR KO, 9 días tras la infección con *Leishmania major* y después de ser tratados con 40µg del anticuerpo α -IL3 o de su correspondiente control de isotipo, durante 6 días. C) Análisis de los números de las distintas subpoblaciones celulares presentes en la dermis de ratones C57BL/6 y GM-CSFR KO, 9 días tras la infección con *Leishmania major* y después del tratamiento descrito en B.

Figura 20. Estudio de la diferenciación *in vitro* de monocitos bajo distintos estímulos en presencia de amastigotes de *Leishmania major*. Análisis del potencial de diferenciación *in vitro* a DCs o macrófagos de los monocitos aislados de la médula ósea de ratones C57BL/6 y cultivados en presencia de GM-CSF o M-CSF y/o de amastigotes *Leishmania major* durante 24 horas.

Figura 21. Estudio de la diferenciación *in vitro* de monocitos bajo distintos estímulos en presencia de amastigotes o promastigotes de *Leishmania major*. A) Análisis comparativo de los porcentajes de DCs y macrófagos diferenciados *in vitro* a partir de monocitos cultivados en presencia de GM-CSF o M-CSF y/o amastigotes o promastigotes de *Leishmania major*. Porcentajes totales de células infectadas. B) Estudio de la viabilidad de los monocitos

cultivados *in vitro* en presencia de GM-CSF o M-CSF y/o promastigotes de *Leishmania major*.
C) Análisis por inmunofluorescencia del grado de internalización de amastigotes o promastigotes de *Leishmania major* en monocitos y moDCs, purificados tras 16h de cultivo *in vitro* mediante métodos inmunomagnéticos.

Figura 22. Análisis de las subpoblaciones de macrófagos presentes en los PO-LNs de ratones C57BL/6, 9 días tras la infección con *Leishmania major*, por métodos inmunohistoquímicos sobre cortes de criostato de PO-LNs y posterior análisis mediante microscopía confocal.

Figura 23. Análisis de las subpoblaciones de macrófagos presentes en los PO-LNs de ratones CCR2 KO, 9 días tras la infección con *Leishmania major*, por métodos inmunohistoquímicos sobre cortes de criostato de PO-LNs y posterior análisis mediante microscopía confocal.

Figura 24. Análisis de las subpoblaciones de macrófagos presentes en los PO-LNs de ratones GM-CSFR KO, 9 días tras la infección con *Leishmania major*, por métodos inmunohistoquímicos sobre cortes de criostato de PO-LNs y posterior análisis mediante microscopía confocal.